

# **Der Einfluss des mikrovaskulären Systems auf das Überleben eines Hauttransplantats**

von Benjamin Motsch

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Der Einfluss des mikrovaskulären Systems auf das  
Überleben eines Hauttransplantats**

von Benjamin Motsch

aus Konstanz

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaften Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Angefertigt am Zentrum für Herzchirurgie Erlangen-Nürnberg  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

Mentor: Prof. Dr. med. Stephan Ensminger

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, PhD

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

**Korreferent/en:** Univ.-Prof. Dr. Andrea Meyer-Lindenberg

Tag der Promotion: 29.07.2017

Meinem Großvater, der den Abschluss dieser Arbeit nicht mehr miterleben  
durfte

Meiner Mutter

Den Mäusen, die für diese Studie ihr wertvollstes gaben, ihr Leben

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1    Aufbau der Haut .....	3
1.2 Das Immunsystem .....	5
1.2.1 MHC .....	5
1.2.2    T-Zellen .....	6
1.2.3    Thrombozyten .....	8
1.2.4    Komplementsystem .....	8
1.2.5    Haut als immunologisches Organ .....	10
1.2.6    Transplantat-Abstoßung .....	10
1.3    Angiogenese .....	13
1.4    Clopidogrel .....	13
1.5    Everolimus .....	14
1.6    Ziel der Studie .....	16
Manuskript: <b>Microvascular integrity plays an important role for graft survival after experimental skin transplantation</b> Motsch et al. (Transplant Immunology 2015)	
3. Diskussion .....	17
3.1    Hauttransplantation als Modell .....	17
3.2    Thrombozyten-Hemmung .....	20
3.3    Kapillarsystem .....	20
3.4    Wundheilung als entzündlicher Prozess .....	21
3.5    Wirkung von Clopidogrel bzw. Everolimus auf die Abstoßung .....	23
3.6    Zusammenfassung und Ausblick .....	25
4. Zusammenfassung .....	26
5. Summary .....	27
6. Literatur .....	28
7. Danksagung .....	32

---

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1	Aufbau der Haut	4
Abb. 2	Maus nach erfolgter Hauttransplantation	19

---

## **Verzeichnis der Abkürzungen**

APC	Antigenpresenting Cell (Antigen-präsentierende Zelle)
ADP	Adenosindiphosphat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
CD-Antigen	Cluster of Differentiation-Antigen
LPS	Lipopolysaccharid
IL	Interleukin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TNF-Rp55	Tumornekrosefaktor-Rezeptor p55
TCR	T Cell Receptor (T-Zell-Rezeptor)
NFAT	Nuclear Factor of Activated T Cells (Kernfaktor von aktivierten T-Zellen)
Stratum	Schicht
MHC	Major Histocompatibility Complex
HLA	Human Leukocyte Antigen
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)



## 1. Einleitung

Viele Krankheiten führen zu einer dauerhaften Schädigung und zu einem Untergang des betroffenen Gewebes. Wenn medizinische Therapien alleine keine Aussicht mehr auf eine vollständige Heilung bieten, eröffnet die Transplantationsmedizin neue Möglichkeiten. Diese Idee begleitete die Medizin über viele Jahrhunderte. Die ersten erfolgreich durchgeführten Transplantationen umfassten unter anderem Hauttransplantationen und die Transplantation von Schilddrüsengewebe Ende des 19. Jahrhunderts.

Ein wichtiger Schritt war dann die rasante Entwicklung der Gefäßchirurgie zu Beginn des 20. Jahrhunderts. In diesem Zusammenhang sind vor allem Mathieu Jaboulay und sein Schüler Alexis Carrel zu nennen. Während dieser Zeit wurden diese Experimente zur Organtransplantation vorerst nur an Tieren durchgeführt, doch bald folgten die ersten Xenotransplantationen, das heißt, es wurden Organe wie z.B. Nieren von Tieren in Menschen verpflanzt. Die Organe wurden jedoch innerhalb von wenigen Tagen abgestoßen. Es musste also eine Reaktion des Empfängerkörpers auf das Spenderorgan vorliegen.

Um die Aufklärung dieser immunologischen Zusammenhänge machte sich in den 40er Jahren des 20. Jahrhunderts der britische Biologe Sir Peter Brian Medawar verdient, der zusammen mit Thomas Gibson 1943 „The fate of skin homografts in man“ [1] veröffentlichte. Den Forschern war aufgefallen, dass autologe Hauttransplantate, d.h. die Grafts kamen von dem Empfänger selbst, im Gegensatz zu homologen Transplantaten, d.h. Spender und Empfänger sind genetisch unterschiedlich, gehören aber zur selben Spezies, nicht abgestoßen wurden. Ebenso blieben die Hauttransplantate zwischen Zwillingen, sowohl eineiigen als auch zweieiigen, vital und ohne sichtbare Abstoßungsreaktion. Wurden einem Patienten nach erfolgreicher Hauttransplantation einige Zeit später Grafts von demselben Spender transplantiert, wurden diese Grafts erheblich schneller abgestoßen. Dies wurde von Medawar und seinen Kollegen als Hinweis interpretiert, dass die Abstoßungsvorgänge vor allem Antikörper-assoziiert ablaufen.

Um die Schwierigkeiten mit der Immunabwehr zu entgehen wurde 1954 die erste erfolgreiche Nierentransplantation zwischen eineiigen Zwillingen durchgeführt [2].

Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Methoden angewandt, um diese Abstoßung zu minimieren bzw. zu verhindern. Nachdem man einigen Erfolg mit Ganzkörperbestrahlung bei der Transplantation von Knochenmark hatte [3], versuchte man eine ähnliche Methode bei anderen Organtransplantationen. Hierbei wurden speziell, die Hauptlymphknoten sowie Thymus und Milz mit mehreren Einzeldosen bestrahlt und somit eine Lymphopenie erzeugt, vor allem der T-Zellen. Diese sogenannte Total Lymphoid Irradiation führte zu einer deutlich längeren Überlebenszeit der Transplantate [4].

Ein anderer Ansatz wurde mit dem Einsatz immunsuppressiver Medikamente verfolgt. Die ersten Erfolge konnten Billingham et al. bei der Verwendung von Kortikosteroiden verbuchen [5], die an sogenannte Glukokortikoid-Rezeptoren (GR) im Zellkern binden. Dadurch werden nicht nur T-Zellen effektiv gehemmt [6], sondern auch die entzündungsbedingte Hyperämie und erhöhte Kapillarpermeabilität verhindert [7] und somit letztendlich die Anzahl der Entzündungszellen in dem betroffenen Gebiet verringert. Mit Azathioprin stand dann ein weiteres Immunsuppressivum zur Verfügung, das vor allem in Kombination mit Kortikosteroiden die Abstoßung von Nierentransplantaten erheblich verzögern konnte [8]. Nach Umwandlung der Pro-Drug Azathioprin in 6-Mercaptopurin (6-MP) verhindert letzteres die DNA-Replikation. Dies hat vor allem auf schnell proliferierende Zellen wie B- und T-Zellen Auswirkungen. Zudem scheint Azathioprin bzw. 6-MP durch Blockade der costimulierenden Funktion von CD28 auf den T-Zell-Rezeptor einen hemmenden Effekt auf T-Zellen [9]. Ein großer Durchbruch gelang schließlich mit der Entdeckung von Cyclosporin A, welches durch Hemmung von Calcineurin die Translokation des Kernfaktors von aktivierten T-Zellen (NFAT) und somit die Expression von Interleukin 2 (IL-2) unterbindet [10].

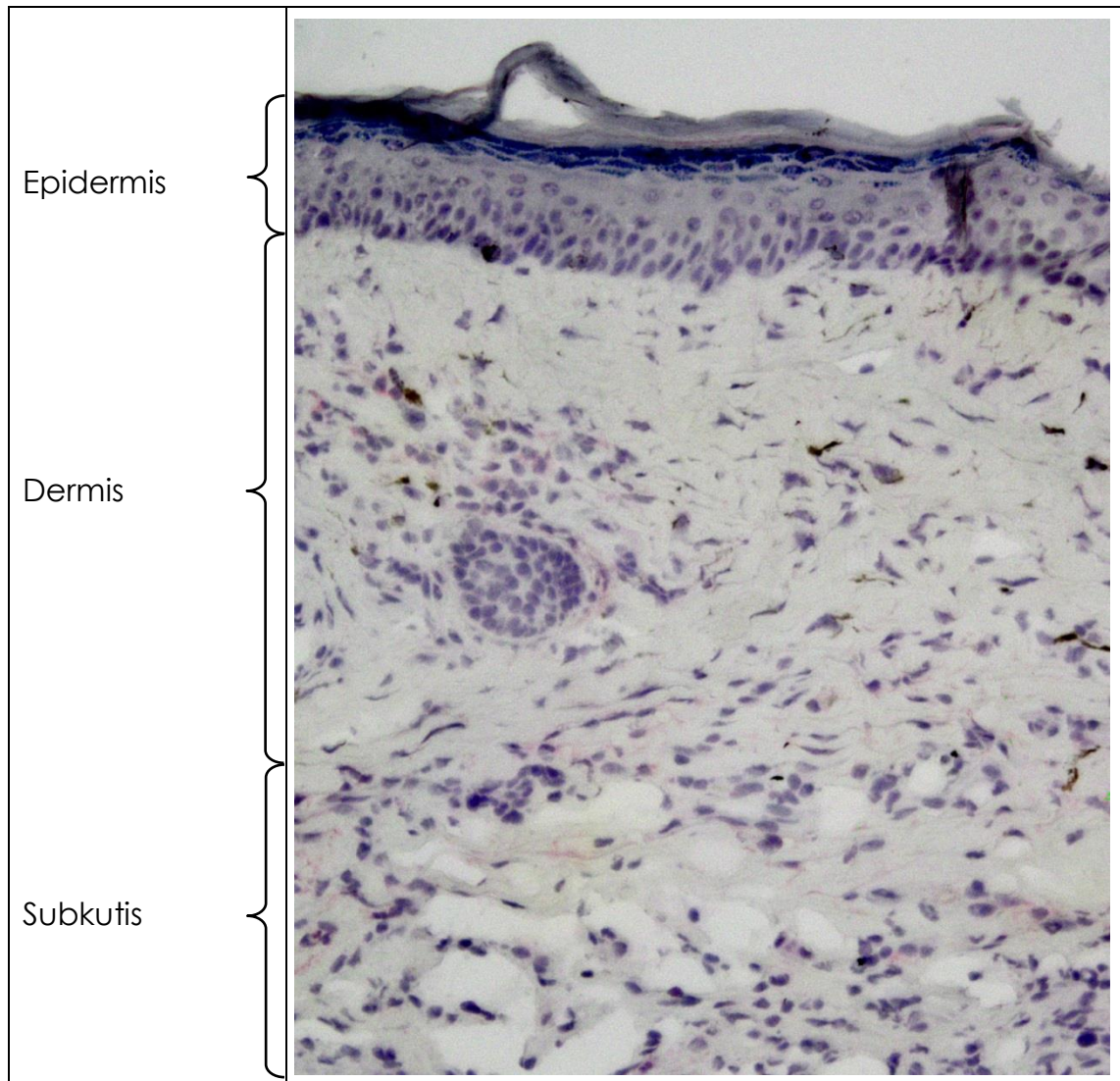
Dadurch konnte zwar die Abstoßungsrate dramatisch reduziert [11], die langfristigen Abstoßungsreaktionen jedoch leider nicht endgültig verhindert werden.

Für viele Patienten bleibt die Transplantation immer noch die einzige Therapiemöglichkeit, dies betrifft im besonderen Patienten mit Herz- [12] und Leberversagen [13]. Da dieser großen Nachfrage nach Organen ein viel zu geringes Angebot entgegensteht [14], besteht ein sehr großer Forschungsbedarf, um die Transplantate funktionstüchtig zu erhalten.

## **1.1 Aufbau der Haut**

Grundlegend unterscheidet man die Unterhaut (Subcutis) und die eigentliche Haut, die wiederum in Lederhaut (Dermis) und die Oberhaut (Epidermis) unterteilt ist (Abb. 1). Die Unterhaut umfasst neben Bindegewebe vor allem Fettgewebe und dient somit als Energiespeicher, der Wärmeisolation und als Verschiebeschicht zwischen der äußeren Körperfaszie sowie der Haut.

Die Epidermis bildet die abschließende Schutzschicht. Das mehrschichtige, verhornende Plattenepithel wird dabei in der untersten Schicht (Stratum), dem Stratum basale, ständig nachgebildet. Während die Zellen vom Stratum basale ausgehend das Stratum spinosum und das Stratum granulosum durchlaufen, findet eine zunehmende Differenzierung und Keratinisierung statt, so dass am Ende im Stratum corneum eine Schicht aus kernlosen, verhornten Keratinozyten vorliegt. Neben den Keratinozyten lassen sich in der Epidermis auch noch weitere Zellpopulationen finden, wie z.B. die Langerhans-Zellen als Teil des mononukleären Phagozytose-Systems oder Berührungszellrezeptoren in Form von Merkelzellen. Melanozyten sitzen ebenfalls in dieser Schicht der Haut und bilden verschiedene Pigmente, um die sie umgebenden Zellen vor schädlichen UV-Strahlen zu schützen.



**Abb. 1: Aufbau der Haut**

Gefrierschnitt eines Hauttransplantats, gefärbt mit Hämatoxylin. Im Bereich der Epidermis können gut das Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum unterschieden werden.

Zwischen Subcutis und Epidermis eingebettet liegt die Dermis. Dabei erfüllt sie insbesondere zwei Aufgaben. Die zahlreichen kollagenen und elastischen Fasern des Stratum reticulare verleihen ihr eine hohe Zug- und Reißfestigkeit und bieten somit einen mechanischen Schutz für den Körper. Im Stratum papillare befinden sich zahlreiche Gefäße, die durch Diffusion die Versorgung der Epidermis mit Nährstoffen sicherstellen, da die Epidermis keine eigene Gefäßversorgung besitzt. Zur Oberflächenvergrößerung sind hier namensgebend zahlreiche Papillen ausgebildet, welche nicht nur die Diffusion erleichtern, sondern auch die mechanische Belastbarkeit verstärken.

Daher ist die Vaskularisation der Dermis entscheidend für die Vitalität der Epidermis verantwortlich.

## **1.2 Das Immunsystem**

Der Organismus ist jederzeit zahlreichen Noxen ausgesetzt. Einen wesentlichen Bestandteil machen dabei Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten aus. Um den Körper vor diesen zu schützen, musste im Laufe der Entwicklung ein System erschaffen werden, welches es dem Körper erlaubt, fremde oder veränderte Strukturen zu erkennen und von eigenen zu unterscheiden. Aus didaktischen Gründen werden die Bestandteile des Immunsystems oft in die angeborene (unspezifische) Immunabwehr, mit den Granulozyten, den Makrophagen sowie dem Komplementsystem, und in die erworbene (spezifische) Immunabwehr, mit T- und B-Lymphozyten, unterteilt. Im Organismus interagieren und ergänzen sich diese beiden Teilsysteme jedoch an vielen Stellen.

### **1.2.1 MHC**

Eine wichtige Komponente für die Erkennung fremder Strukturen bildet der sogenannte Major Histocompatibility Complex, kurz MHC. Dabei handelt es sich um Gene, die membranständige Proteinkomplexe codieren, welche in zwei Ausprägungen als MHC I und MHC II vorkommen.

Auf der Oberfläche fast aller kernhaltiger Körperzellen findet man MHC I. Diese werden konstant neu gebildet und nehmen Peptide aus dem Zytosol auf, die während verschiedener Abbau- und Synthesevorgängen entstehen. Dadurch präsentiert die Zelle gleichsam jederzeit ein Inventar ihrer Peptide. Des Weiteren vermittelt der MHC I auch einen Schutz vor der eigenen Abwehr. Treffen NK-Zellen auf Zellen mit verändertem MHC I oder einer zu geringen Dichte an MHC I, werden die potentiell gefährlichen Zellen von den NK-Zellen zerstört [15].

MHC II hingegen kommt nur auf sog. Antigen-präsentierenden Zellen (APC) vor, zu denen die dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten und B-Zellen zählen. Neben strukturellen Unterschieden zu MHC I werden diese nicht mit freien Peptiden aus dem Zytosol beladen, sondern gezielt mit Fragmenten aus intrazellulären Vesikeln, welche unter anderem beim Abbau von Krankheitserregern entstehen [15]. Dies stellt eine wichtige Verbindung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunität dar.

Durch das Vorhandensein mehrerer Gene jeweils für MHC I und MHC II und zudem multipler Allele für diese Gene ist der MHC polygen und polymorph. D.h. ein Individuum kann eine Vielzahl an unterschiedlichen MHC I bzw. MHC II produzieren, die zwar alle von der Funktion her identisch sind, sich jedoch in ihrer Fähigkeit, bestimmte Peptide zu binden, unterscheiden. Dadurch wird es Krankheitserregern erschwert, diesem Mechanismus und damit ihrer Entdeckung auszuweichen. Auch bei der Transplantation von Organen spielt der MHC eine wichtige Rolle. Unterscheidet sich der MHC von Spender und Empfänger, wird das Transplantat schnell durch die zellvermittelte Abwehr zerstört. Daher wird vor einer Transplantation nach Möglichkeit eine Typisierung von Spender und Empfänger vorgenommen. Während bei Nierentransplantationen meistens eine Typisierung durchgeführt wird, reicht die kurze Ischämiezeit bei Herztransplantationen meist nicht für eine vollständige Typisierung aus. Durch die enorme Vielfalt der Gene ist es jedoch sehr schwierig außer bei nahen Verwandten eine vollständige Übereinstimmung der MHC-Gene zu finden, die beim Menschen HLA-Gene (human leukocyte antigen) genannt werden [15].

### **1.2.2 T-Zellen**

Die T-Lymphozyten, oder kurz T-Zellen, gehören zur adaptiven Immunabwehr. Es können verschiedene Subklassen von T-Zellen anhand von Strukturen auf der Oberfläche der Zellen unterschieden werden, sogenannte Cluster of Differentiation (CD). Allen T-Zellen gemeinsam ist eine Abstammung von

pluripotenten Knochenmarkstammzellen, die Reifung im Thymus und ein T-Zell-Rezeptor (TCR). Dieser TCR variiert von T-Zelle zu T-Zelle und erlaubt die Erkennung von Antigenen, die an MHC gebunden präsentiert werden. Während der Reifung im Thymus erfolgt eine Selektion der naiven T-Zellen. Dabei werden T-Zellen, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, physiologischerweise aussortiert und so der Körper vor diesen autoimmun-reagierenden T-Zellen geschützt. Im Laufe dieser Reifung differenzieren sich die T-Zellen auch weiter in verschiedene Subklassen, von denen die CD4+- und die CD8+-T-Zellen von besonderer Bedeutung sind.

Erstere werden auch T-Helferzellen genannt und dienen der Koordination der Immunantwort. Sie erkennen vor allem auf MHC II präsentierte Antigene und können verschiedene Zytokine ausschütten. Anhand des Zytokin-Profiles werden sie in TH1, TH2 oder TH17 unterteilt und stimulieren je nach Subtyp die B-Zell-Aktivierung oder die angeborene Immunabwehr. Eine weitere Sonderform der CD4+-T-Zellen sind die regulatorisch wirksamen T<sub>REG</sub>-Zellen, denn diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie körpereigene Antigene an ihrem TCR binden. Sie lösen jedoch keine Immunantwort aus, sondern greifen regulatorisch in die Immunantwort ein und verhindern überschießende Reaktionen. Ein Fehlen dieser T<sub>REG</sub>-Zellen kann zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen führen [15].

Die CD8+, zytotoxischen T-Zellen hingegen erkennen und töten infizierte sowie veränderte Zellen. Wie weiter oben beschrieben präsentieren Körperzellen auf ihrem MHC I einen Querschnitt der aktuell vorhandenen Peptide. Wurde eine Zelle von einem Virus infiziert, erscheinen daraufhin auch Virus-Bausteine auf dem MHC I der infizierten Zelle. Eine zytotoxische T-Zelle kann das auf dem MHC I gebundene Antigen erkennen und leitet die Apoptose (programmierter Zelltod) der infizierten Zelle ein. Zu diesem Zweck enthalten die CD8+-T-Zellen eine Vielzahl von mit zytotoxischen Proteinen gefüllte Granula, die sie nach Kontakt mit der Zielzelle an diese abgeben und im Zytosol der zum Untergang bestimmten Zelle eine Reihe von Enzymen aktivieren. Dies führt zu einer Fragmentierung der DNA und einem Schrumpfen

der Zelle, die daraufhin schnell von Phagocyten beseitigt. Benachbarte, nicht infizierte Zellen bleiben bei diesem Vorgang verschont.

### **1.2.3 Thrombozyten**

Primäre Aufgabe der Thrombozyten ist ihre Beteiligung an der Hämostase. Die zellkernlosen Blutplättchen entstehen aus Megakaryozyten, welche ihren Ursprung im Knochenmark haben. Trotz des Fehlens eines Zellkerns sind sie zur Synthese zahlreicher Proteine fähig, die sie in ihren Granula speichern und bei Aktivierung an die Umgebung abgeben können. Im Besonderen werden mehrere Glykoproteine (GP) exprimiert, die der Aktivierung und Adhäsion der Thrombozyten dienen. Im Falle einer Gefäßverletzung binden die freigelegten Kollagenstrukturen den im Blut zirkulierenden von-Willebrand-Faktor (vWF), an den nun Thrombozyten über den GPIbIX-Komplex binden können. Die aktivierten Thrombozyten unterliegen morphologischen Veränderungen, wodurch der Fibrinogen-bindende GPIIb/IIIa-Komplex gebildet und Adenosindiphosphat (ADP) sowie Thromboxan A2 sezerniert wird. Durch diese Vorgänge werden weitere Thrombozyten aktiviert, welche sich dann über die genannten GP-Komplexe unter einander vernetzen und so einen weiteren Blutverlust verhindern. Der gebildete Thrombus dient im weiteren Verlauf als Gerüst für die Reparatur des Defekts.

Die sezernierten Zytokine, unter anderem P-Selektin, locken auch vermehrt Leukozyten an, welche vor Ort dann von den Thrombozyten aktiviert werden sowie Aggregate mit ihnen bilden [16]. Somit tragen Blutplättchen maßgeblich zu entzündlichen Reaktionen in Gefäßen bei [17, 18].

### **1.2.4 Komplementsystem**

Neben der zellulären Abwehr existiert auch die humorale Abwehr, mit den Antikörpern auf der Seite der adaptiven Immunität und dem Komplementsystem auf Seiten der angeborenen. Die Bestandteile des



Komplementsystems (abgekürzt als CX, mit X=1,2,3, ...) zirkulieren als Proenzyme bis zu ihrer Aktivierung durch den Blutkreislauf. Bei einer Aktivierung durchlaufen die Komponenten eine Aktivierungskaskade, wobei die aktivierten Formen jeweils Enzyme bilden, deren Substrat die nachfolgenden Komplement-Komponenten sind. Diese Aktivierung kann auf drei Wegen, „klassisch“, „alternativ“ oder auf dem Lektin-Weg erfolgen, erfolgen. Klassischerweise bindet C1 an den Fc-Teil von Antikörpern, erfährt dadurch eine Konformationsänderung zu C1s und spaltet C4 zu dem löslichen C4a und C4b. Dieses C4b bindet nun C2, welches als C2a mit C4b die sogenannte C3-Convertase bildet, die wiederum C3 in C3a und C3b spaltet. C3a wirkt chemotaktisch auf Mastzellen, während sich C3b an den bestehenden Komplex C4bC2a anlagert und somit in der Lage ist, als C5-Convertase C5 in C5a und C5b zu spalten. Zusammen mit C6, C7 und C8 synthetisiert C5b dann C9, welches den sogenannten Membran-Attacking-Complex (MAC) formiert, während C5a ähnlich wie C3a der Chemotaxis dient. Im Blut zerfallen auch fortwährend kleinere Mengen an C3 spontan zu C3a und C3b. Dieses freie C3b kann an viele Zelloberflächen binden, wird jedoch an körpereigenen Zellen schnell inaktiviert. An Lipopolysaccharid-reichen Oberflächen von Bakterien bleibt es jedoch stabil und kann mit dem Faktor B die alternative C5-Convertase C3bBb bilden, welche von Properdin stabilisiert wird. Die restliche Kaskade erfolgt wie im klassischen Weg. Als dritte Möglichkeit existiert der Lektin-Weg. Dabei bindet das Mannosebindende Lektin (MBL) an Mannosereste an Zellmembranen, wie sie vor allem bei Bakterien existieren. Diese Mannose-Lektin-Komplexe aktivieren die MBL-assoziierten Serinproteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3, die dann ähnliche wie im klassischen Weg den Prozess von C4 zu C4bC2a induzieren [15].

Nach der Aktivierung des Komplementsystems auf dem klassischen Weg durch Antikörper verbleiben Bestandteile von C4 als C4d an die Zelloberflächen des Zielgebietes gebunden. Da diese Bindung relativ stabil ist, kann mit C4d immunhistochemisch eine Antikörpervermittelte Reaktion nachgewiesen werden [19].

### **1.2.5 Haut als immunologisches Organ**

Als erste Barriere müssen Mikroorganismen die äußere Schicht der Epidermis überwinden. Dabei wird das Eindringen schon durch die engen Zellverbindungen des Stratum corneum physikalisch erschwert. Als weitere Maßnahme werden in der Epidermis eine Reihe von Peptiden gebildet, die deutlich antimikrobielle Eigenschaften besitzen [20]. Der pH-Wert der Hautoberfläche liegt zudem deutlich unter dem physiologischen pH-Wert von 7,4. Dadurch wird das Wachstum vieler Keime erschwert, während die Keimflora der Haut unbeeinflusst bleibt [21].

Wenn Erreger schließlich in die Epidermis eindringen konnten, treffen sie auf Langerhans-Zellen, ruhende dendritische Zellen. Diese Abwehrzellen können Erreger und Erregerbestandteile, vor allem Lipopolysaccharid (LPS), erkennen, phagozytieren und prozessieren. Sobald sie mit Antigen beladen wurden, wandern die Langerhans-Zellen aus der Haut aus und über afferente Lymphgefäße in den regionalen Lymphknoten. Während dieser Wanderung findet eine Reifung der Zellen statt, durch die sie ihre Fähigkeit zur Phagozytose verlieren, aber dafür die Synthese von MHC II sowie costimulierende B7-Molekülen erhöhen. Im Lymphknoten angekommen, präsentieren sie das prozessierte Antigen über MHCII an CD4+-T-Zellen, welche nun ihrerseits andere Abwehrzellen aktivieren, aber auch über die Blutbahn zu dem Ort der Infektion zurückkehren und sich dort an der Abwehr beteiligen [15].

### **1.2.6 Transplantat-Abstoßung**

Wie schon eingangs angesprochen, treten nach einer Organtransplantation Abstoßungsreaktionen auf, bei denen in Abhängigkeit von der Dauer bis zur Abstoßung und von den beteiligten Komponenten derzeit drei Formen differenziert werden.

Die hyperakute Abstoßung erfolgt innerhalb von Minuten bis Stunden aufgrund von präformierten Antikörpern, die einen entzündungsbedingtem Gefäßverschluss in dem transplantierten Organ herbeiführen. Der konsekutive Blutstau resultiert schließlich in einem Absterben des Gewebes. Die Antikörper gegen Antigene des Transplantats können z.B. aufgrund einer vorangegangenen Transplantation vorhanden sein oder sich gegen AB0-Antigene richten, welche auch auf Endothelzellen gefunden werden können. Aus diesem Grund sollte vor einer Transplantation eine Kreuzprobe zwischen Spender und Empfänger durchgeführt und somit eine hyperakute Abstoßung nach Möglichkeit vermieden werden [15].

Erfolgte eine entsprechende Voruntersuchung zur Vermeidung der hyperakuten Abstoßung, kommt es häufig innerhalb der ersten Tage zur akuten, T-Zell-vermittelten Abstoßung. Die erforderliche Erkennung der fremden Antigene kann sowohl direkt als auch indirekt erfolgen. In ersterem Fall wandern APCs des Spenders aus dem transplantierten Organ in die nächstgelegenen Lymphknoten, um sich dort den vorhandenen T-Zellen zu präsentieren. Da sich der MHC I der Spender-APCs jedoch meist von dem des Empfängers unterscheidet, reagieren die CD8+-T-Zellen auf den „Eindringling“ indem sie in das fremde Gewebe wandern und dieses zerstören. Die ebenso vorhandenen TH1-Zellen werden von den körperfremden Antigenen auf dem MHC II der APCs aktiviert und stimulieren so zusätzlich die CD8+-T-Zellen. Bei der indirekten Erkennung werden die fremden Proteine und Peptide aus dem Spenderorgan von den APCs des Empfängers aufgenommen und in den lymphatischen Geweben über den MHC II präsentiert. Die Zerstörung des Transplantats erfolgt dann eher durch Makrophagen, die von aktivierten CD4+-T-Zellen herangelockt wurden [15]. Ebenso werden durch die T-Helferzellen verstärkt B-Zellen aktiviert und entsprechende Alloantikörper, d.h. Antikörper gegen Spende-Antigen, produziert. Neben diesen beiden Wegen wird noch ein dritter, semi-direkter Weg diskutiert [22]. In diesem Fall werden MHC-Strukturen über Exosomen oder durch Zell-Zell-Kontakte von Spender-APCs auf Empfänger-APCs übertragen. Diese chimären Zellen stimulieren

dann in ähnlicher Weise wie beim direkten Weg mit Spender-Antigen auf Fremd-MHC die CD8+-T-Zellen des Empfängers, zusätzlich werden jedoch von denselben APCs auch CD4+-T-Zellen über Antigen auf Empfänger-MHC aktiviert und es findet somit eine unmittelbare Unterstützung der CD8+-T-Zell-Aktivierung statt.

Daher wird, wie bereits erwähnt, versucht, einen MHC-Match zwischen Spender und Empfänger zu erhalten. Dies ist jedoch nur eingeschränkt möglich, so dass man deswegen bemüht ist, die Abstoßung durch eine Immunsuppression zu verhindern.

Die dritte Form tritt im Verlauf von Wochen und Monaten als chronische Abstoßung auf. Diese macht sich durch eine zunehmende Verengung der kleinen Blutgefäße im Transplantat bemerkbar. Aufgrund der pathologischen Beteiligung der Gefäße wird die chronische Abstoßung auch als Transplantat-Arteriosklerose (TxA) bzw. Transplantat-Vaskulopathie (TVP) bezeichnet. Morphologisch zeigt sich die TxA als konzentrische Proliferation der Intima der Gefäße mit einer großen Anzahl an glatten Muskelzellen und einer Infiltration von Makrophagen und T-Zellen [23]. Dabei unterscheidet sich die TxA von einer systemisch bedingten Arteriosklerose, da bei letzterer vor allem lokale Plaques auftreten, während bei einer TxA eine gleichmäßige, diffuse Proliferation beobachtet werden kann. Als Ursachen für diese entzündlichen Veränderungen werden verschiedene Faktoren diskutiert, darunter vor allem Ischämiedauer, Reperfusionsschäden, Zytomegalie-Infektionen und Stoffwechsel-erkrankungen [23, 24]. In diesem Zusammenhang rücken auch Thrombozyten als relevanter Bestandteil des Immunsystems immer mehr in den Vordergrund, da diese in engen Kontakt mit den Endothelen des Transplantats stehen [25] und nachweislich an entzündlichen Reaktionen der Gefäße beteiligt sind [17].

### 1.3 Angiogenese

Ein wesentlicher Bestandteil bei der Wundheilung ist die Wiederherstellung der Gefäßversorgung. Bisher wurden zwei Arten unterschieden, die sich durch den Ursprung der beteiligten Endothelzellen unterscheiden. Im Fall der Vasculogenese stammen die Endothelzellen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab, während bei der Angiogenese die vor Ort existierenden Endothelzellen aktiviert und zur Proliferation angeregt werden. Während die Vasculogenese nach der Embryonalzeit zunehmend an Bedeutung verliert [26], bleibt die Angiogenese zeitlebens ein wichtiger Bestandteil der Wundheilung und verschiedener Anpassungsprozesse.

Hypoxische Zustände in einem Gewebe sind ein typischer Stimulus für Angiogenese, da von dem betroffenen Gewebe massiv Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) ausgeschüttet wird. Dem Dichtegradienten von VEGF-A folgend bahnen sich sogenannte „tip cells“ ihren Weg durch die extrazelluläre Matrix (ECM). Dabei bilden diese fadenförmige Filopodia aus, die proteolytische Enzyme ausscheiden, und somit so die ECM auf ihrem Weg auflösen. In den entstandenen Tunnel wandern weitere Endothelzellen ein und kleiden das Lumen des neu entstehenden Gefäßes aus. Da dieser Prozess meist von mindestens zwei Seiten aus vonstattengeht, treffen am Ort der höchsten VEGF-A-Konzentration die „tip cells“ aufeinander, verschmelzen und bilden so ein durchgängiges Gefäß. Im Anschluss daran finden unter dem Einfluss der mechanischen Belastung Reifeprozesse in der Gefäßwand und der ECM statt [27]. Dabei wird der gesamte Vorgang durch ein komplexes System aus pro-Angiogenese- und anti-Angiogenese-Faktoren gesteuert [28].

### 1.4 Clopidogrel

Eine wichtige Komponente bei der Aktivierung von Thrombozyten ist ADP. So können auf der Oberfläche von Thrombozyten zwei spezifische Rezeptoren für ADP, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>, gefunden werden. Da zudem in den Granula ADP gespeichert und bei Aktivierung ausgeschüttet wird, verstärkt sich dadurch

die Antwort auf die Aktivierung um ein vielfaches. Beide Rezeptoren sind mit G-Proteinen gekoppelt, die für die weitere Signalübertragung verantwortlich sind. Während der Verlust des P2Y<sub>1</sub> bei Knockout-Mäusen die Fähigkeit zur Aggregation zwar einschränkte, scheint P2Y<sub>12</sub> für die Funktion hingegen essentiell zu sein [29]. Diesen Angriffspunkt macht man sich bei der Thrombozyten-Aggregationshemmung mit Clopidogrel zu Nutze. Clopidogrel, unter dem Handelsnamen Plavix® (Sanofi-Aventis, Berlin, Deutschland) erhältlich, gehört zu den Thienopyridinen und muss nach der Einnahme erst in der Leber verstoffwechselt werden, um den wirksamen Metaboliten zu bilden. Dieser bindet dann irreversibel durch Disulfid-Brückenbildung an den Rezeptor P2Y<sub>12</sub> auf Thrombozyten [30] und hemmt dadurch dauerhaft die Aktivierung und Aggregation dieser [31].

### **1.5 Everolimus**

Wie viele andere Wirkstoffe wurde auch der Everolimus-Vorgänger Rapamycin zufällig als Produkt einer Streptomyces-Art entdeckt. Namensgebend für dieses makrozyklische Lakton war die Insel Rapa Nui, auf der man auf Streptomyces hygroscopicus stieß. Rapamycin wurde vorerst aufgrund seiner antifungalen Eigenschaften bekannt [32-34], einige Zeit später jedoch wurde man seiner Fähigkeit zur Immunsuppression gewahr [35, 36].

Normalerweise liegen naive T-Zellen bis zu ihrer Aktivierung durch ein passendes Antigen in einem ruhenden Zustand vor. Bei Kontakt mit APCs, die neben MHC II auch B7-Moleküle zur Costimulation exprimieren, werden die T-Zellen angeregt, zu proliferieren und zu T-Effektorzellen zu differenzieren. Sie treten dabei von der G<sub>0</sub>- in die G<sub>1</sub>-Phase über und beginnen mit einer erhöhten mRNA- sowie Proteinsynthese. Entscheidend dabei ist die Produktion des Interleukin 2 (IL-2) und der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors. Dieser IL-2-Rezeptor weist bei ruhenden T-Zellen eine geringe Affinität für IL-2 auf, nach der Aktivierung wird zusammen mit der  $\alpha$ -Kette daraus ein Rezeptor mit einer

hohen Affinität für IL-2. Der einsetzende, selbstverstärkende Effekt führt zum Fortschreiten der T-Zelle in die S-Phase des Zell-Zyklus und damit zu ihrer Proliferation [15].

Rapamycin bindet in der Zelle an das FK506-bindende Protein 12 (FKBP12), welche dann als Komplex das mammalian target of rapamycin (mTOR) hemmen. Dies verhindert nun die Proliferation der T-Zelle auf zwei Wegen, da sowohl die Translation der mRNA und somit die Proteinsynthese vermindert, als auch die Signalübertragung von dem IL-2-Rezeptor blockiert wird. Die T-Zelle wird dadurch praktisch in der G1-Phase gehalten und stirbt mangels aktivierender Signale ab [37].

Da neben der erwünschten Immunsuppression auch immer eine Reihe von Nebenwirkungen auftraten, wurde die Entwicklung von Rapamycin-Analoga vorangetrieben. Das hier verwendete Everolimus (Certican ®; Novartis, München, Deutschland) bot durch seine schnellere Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme und der kürzeren Halbwertszeit den Vorteil, den Wirkstoffspiegel besser einstellen und so den Bedürfnissen der Patienten anpassen zu können [38]. Daneben wirkt Everolimus als Rapamycin-Analoga im Vergleich zu Calcineurin-Inhibitoren, wie Cyclosporin oder Tacrolimus, auch erheblich weniger nephrotoxisch [38, 39]. Aufgrund unterschiedlicher Angriffspunkte bei der T-Zell-Hemmung konnte man jedoch Everolimus gut mit Calcineurin-Inhibitoren kombinieren und durch die synergistische Wirkung die jeweilige Dosierung und damit die Nebenwirkungen reduzieren [38]. Ferner traten bei der Einnahme von Everolimus im Vergleich zu Rapamycin seltener Symptome einer Glucose-Intoleranz auf [40]. Aus diesen Gründen wird Everolimus mittlerweile bei vielen Transplantationen für die post-operative Immunsuppression angewendet [41-43].

## **1.6 Ziel der Studie**

Da bei vorangegangenen Studien für die beiden Medikamente Clopidogrel (Plavix®; Sanofi-Aventis, Berlin, Deutschland) und Everolimus (Certican®; Novartis, München, Deutschland) ein günstiger Effekt in Bezug auf die chronische Abstoßung nach Transplantation nachgewiesen werden konnte [44-46], sollte in dieser Studie der Einfluss von Clopidogrel allein oder in Kombination mit Everolimus auf die Ausprägung der mikrovaskulären Struktur im Transplantat analysiert werden.

Das Hauttransplantationsmodell an der Maus bietet dabei den Vorteil, dass die Versorgung des Gewebes hauptsächlich über mikrovaskuläre Gefäße erfolgt und die Kapillardichte in der Haut histologisch gut dargestellt werden kann. Als vorderste immunologische Barriere laufen Abstoßungsreaktionen nach einer allogenen Hauttransplantation rapide ab, wobei sich dieser Prozess über den gesamten Verlauf beobachten lässt, ohne die Maus dafür töten zu müssen. Dies ermöglichte die Durchführung einer Transplantat-Überlebens-Analyse, um so der Frage nachzugehen, ob der Zustand der mikrovaskulären Gefäße einen Einfluss auf die Überlebenszeit der Hauttransplantate hat.





# Microvascular integrity plays an important role for graft survival after experimental skin transplantation



Benjamin Motsch, Christian Heim, Nina Koch, Martina Ramsperger-Gleixner, Michael Weyand, Stephan M. Ensminger <sup>\*,1</sup>

Department of Cardiac Surgery, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 18 June 2015

Received in revised form 24 September 2015

Accepted 25 September 2015

Available online 28 September 2015

### Keywords:

Skin transplantation

Platelets

CD31

C4d

Microvessels

## ABSTRACT

**Background:** Every transplanted organ relies on a reliable and sound vascular system. Therefore, our study focused on the investigation if platelet inhibition alone or combined with mTOR-inhibition has a beneficial effect on the microvascular integrity in allogeneic murine skin grafts.

**Methods:** Skin transplantation was performed from fully MHC-mismatched C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) donors to CBA/J (H-2<sup>k</sup>) recipient mice. Skin allograft recipients were assigned to several experimental groups and either treated with clopidogrel alone, everolimus alone or a combination of both. Graft survival was evaluated and transplants were harvested after 8 days and analyzed for CD31 and C4d by immunohistochemistry.

**Results:** Untreated allografts showed a reduced amount of CD31 on postoperative day 8 as well as an increase in C4d compared to isografts. All treated animals showed a significant improvement regarding CD31 [ $1577.7 \pm 200.4$  (clopidogrel)/ $1702.8 \pm 151.1$  (clopidogrel + everolimus) vs.  $479.7 \pm 184.2$  (control),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ] and C4d [ $420.9 \pm 70.9$  (clopidogrel)/ $324.5 \pm 77.3$  (clopidogrel + everolimus) vs.  $772.4 \pm 159.7$  (control),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ]. In addition, skin grafts of animals treated with clopidogrel and everolimus survived significantly longer compared to untreated controls [ $19.2 \pm 4.2$  d vs.  $12.8 \pm 2.4$  d,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ].

**Conclusion:** In this study we could show that clopidogrel alone and in combination with everolimus substantially improved microvascular integrity and resulted in increased survival time of skin grafts.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Despite dramatic donor organ shortage, cardiac transplantation still remains the gold standard for the treatment of end-stage heart failure patients. Progress in the development of immunosuppressive therapy has decreased the incidence of acute rejection episodes, but the development of transplant coronary arteriosclerosis continues to limit the survival of heart transplant recipients and is still the leading cause of late mortality after heart transplantation [1]. Different pathogenic mechanisms have been suggested to be involved in the development of transplant arteriosclerosis, including immune mediated vascular injury, inflammation of the vascular endothelium, ischemia reperfusion injury, cytomegalovirus infection and metabolic risk factors [2].

As interactions of platelets with the endothelium induce significant changes in the adhesive and chemotactic properties of endothelial cells that are able to trigger monocyte adhesion and transmigration

resulting in an inflammatory reaction throughout the vessel wall [3,4], our recent interest has focused on the involvement of platelets in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis. Here we could recently show that monotherapy with clopidogrel effectively reduced the formation of transplant arteriosclerosis in a fully allogeneic murine aortic allograft model [5], even when it was administered in a delayed fashion [6]. Clopidogrel, a member of the thienopyridines, has become an important therapeutic agent for patients with coronary heart disease [7,8] and clopidogrel therapy has been shown to decrease the incidence of coronary artery stent thrombosis and to reduce myocardial infarction, stroke and vascular death within these patients [8]. It inhibits platelet activation by blocking the adenosine diphosphate (ADP) receptor P2Y<sub>12</sub> on platelets [9,10].

As monotherapy with clopidogrel seemed to have no influence on the T-cell infiltration of the allogeneic aortic grafts a combination of a T-cell modulating agent such as a calcineurin antagonist (cyclosporine) and mTOR inhibitor (everolimus) was investigated in the following set of experiments. Only treatment with clopidogrel and everolimus resulted in a striking reduction of transplant arteriosclerosis, whereas application of cyclosporine and clopidogrel showed no additive effect [11]. This was also demonstrated in an orthotopic tracheal transplant model, where we could show that platelet inhibition with clopidogrel in reduced levels of T-cell and macrophage infiltration is associated

<sup>\*</sup> Corresponding author at: Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Heart and Diabetes Center NRW, Ruhr-University Bochum, Georgstrasse 11, 32545 Bad Oeyenhausen, Germany.

E-mail address: [sensminger@hdz-nrw.de](mailto:sensminger@hdz-nrw.de) (S.M. Ensminger).

<sup>1</sup> Present address: Heart and Diabetes Center NRW, Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Ruhr-University Bochum, Georgstrasse 11, 32545 Bad Oeyenhausen, Germany.



with diminished tracheal obliteration and lower expression levels of inflammatory cytokines and adhesion molecules. Concomitant application of an mTOR inhibitor had an additive effect and further reduced the formation of obliterative airway disease (OAD) [12]. In this context it has been shown that untreated orthotopic tracheal allografts undergo a decrease of vascular perfusion associated with a loss of endothelial cells in the early days after transplantation whereas isografts and immunosuppressed allografts were preserved [13]. Having shown an inhibitory effect of clopidogrel in mice on platelet activation [5] we speculated at this stage that beside immunosuppressive effects, targeting platelets by clopidogrel may also mitigate the process of OAD by improving allograft perfusion and therefore reduce intragraft tissue hypoxia as platelet inhibition is well known to have a beneficial effect on hemodynamics in particular within the microvasculature.

## 2. Objective

Therefore, the aim of the current study was to investigate if platelet inhibition alone or combined with mTOR-inhibition has a beneficial effect on the microvascular integrity in a murine skin transplantation model. This particular experimental model was chosen, as graft survival of skin transplants mainly depends on the blood supply provided through the microvessels within the skin and therefore if our hypothesis is correct, preservation of microvascular integrity would result in improved skin graft survival.

## 3. Material and methods

### 3.1. Transplants

All mice were treated and housed according to protocols approved by the animal care and use committee of the government (Regierung Mittelfranken, AZ: 54–2532.1–46/12) in the Franz-Pentzold-Zentrum (Erlangen, Germany). C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) and CBA/J (H-2<sup>k</sup>) mice aged between 8 and 12 weeks were received from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Skin-transplantation was performed similar to the technique initially described by Billingham and Medawar [14]. Briefly, the skin from the tail of a euthanized C57BL/6 mouse was removed by applying a circular incision at the base and pulling it off. Gender-matched CBA/J as recipient was anesthetized with isoflurane and prepared for transplantation by shaving the hair of the left dorsal chest. A small piece of adhesive tape was used as a frame and the inside this frame about 1 cm<sup>2</sup> of the epidermis and dermis was removed leaving the muscles intact. The grafts were fitted into the frame and bandaged for 8 days.

### 3.2. Treatment protocol

All drugs were administered by intraperitoneal injection and the recipient mice were treated according to the following protocol. The animals were treated either with clopidogrel alone (C: 20 mg/kg), everolimus alone (E: 0.05 mg/kg) or a combination of both drugs (EC: 20 mg/kg clopidogrel and 0.05 mg/kg everolimus). There were also two untreated groups as controls, untreated allografts as positive control (Po) and a group with isografts as negative control (Ne). This treatment pattern was already introduced by our group [12,15]. Since clopidogrel is not stable, we daily prepared the solutions for the intraperitoneal injections. Clopidogrel (Plavix®; Sanofi-Aventis, Berlin, Germany) and everolimus (Certican®; Novartis, München, Germany) was obtained from the hospital pharmacy and further processed and diluted to reach desired concentrations of the respective drug.

### 3.3. Immunohistology

For immunohistochemical analysis animals were sacrificed on postoperative day 8, harvested skin-transplants were covered in

Tissue-Tek® (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) and flash frozen in liquid nitrogen. The tissue was then cut into 4 µm slices, air-dried and fixed for 10 min in acetone.

Slides were rehydrated and pre-incubated in staining buffer (0.1 Tris, pH 7.5 and 0.1% Tween 20) for 5 min. Afterwards sections were incubated with the primary antibodies at room temperature for 60 min. The slides were then washed and treated for 60 min with secondary antibodies. Visualization was reached with Liquid Permanent Red (Dako Deutschland GmbH; Hamburg, Germany). After 10 min the slides were washed with ultrapure water, stained with hematoxylin and washed again. The final step was the sealing with Vecta Mount AQ (Vector Laboratories, Inc.; Burlingame, CA, U.S.A.). A digitized image of the respective stained section was analyzed with cellSens Dimension (Olympus, Germany). A predefined frame was applied on the image and the stained area inside the frame was measured (Fig. 1). The frame covered the whole area from the epidermis to the hypodermis in all samples. We analyzed five sections of each specimen and averaged the results before comparison.

The following antibodies and conjugates were used: rabbit anti-mouse CD31 and rabbit anti-mouse C4d (Abcam plc; Cambridge, UK) as primary antibodies, and goat anti-rabbit IgG-AP (Invitrogen, Life Technologies GmbH; Darmstadt, Germany) as secondary antibody.

### 3.4. Graft-survival

Graft viability was analyzed by daily observation and photo documentation of the transplanted skin. During the rejection process the blood supply into the graft is progressively restricted, which can be observed as an increasing area of necrosis within the graft. Transplants were classified as vivid if the necrotic part was less than 75%.

### 3.5. Platelet aggregation

In order to ensure an effective inhibition of the platelet aggregation throughout the whole experiment, we investigated the effect of the applied drugs on the platelets with a Multiplate® analyzer (Roche, Switzerland). In contrast to our previously published experiments [12, 15] blood could be used without further processing instead of preparing platelet rich plasma (PRP) first. 500 µl of blood was collected from the treated mice and immediately mixed with 100 µl of a prepared hirudin-solution (acquired from Monovette®, Sarstedt AG, Germany), so the final concentration of hirudin in the sample amounted to 0.0675 mg/ml. The mixed blood was then analyzed using multiple electrode aggregometry after stimulation with 0.02 mmol/l ADP as described by Tóth et al. [16]. The read out was the area under the aggregation curve measured in "U".

### 3.6. Statistical methods

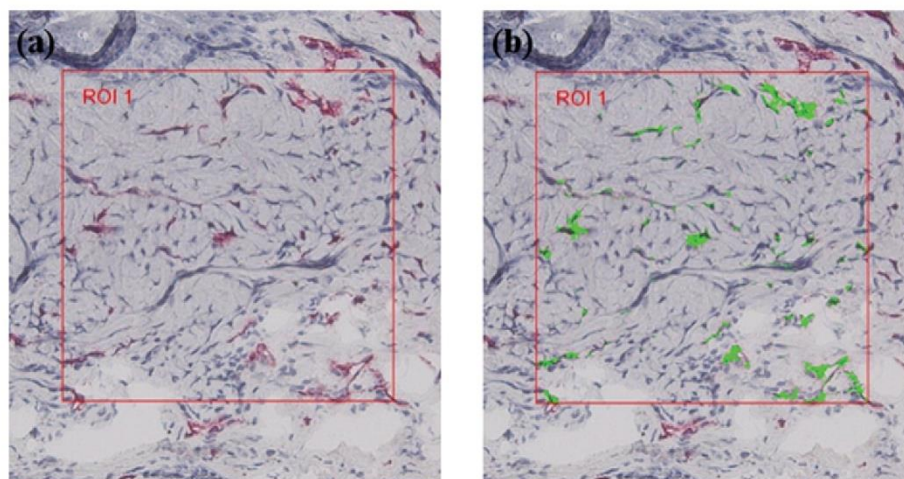
The data in the graphs are presented as means ± standard deviation. The comparison of two groups of the histological analysis was performed by a Student's T-Test with an adaption according to Bonferroni-Holm. For the analysis of the graft-survival we used a Log-Rank-Test with a Chi-Quadrat-Test for post-hoc testing.

## 4. Results

### 4.1. Monitoring platelet aggregation after treatment with clopidogrel alone and in combination with everolimus

To ensure effective platelet inhibition, blood was collected from treated CBA/J (H-2<sup>k</sup>) mice as well as an untreated control group on days 3 and 8. Platelet aggregation was analyzed by multiple electrode aggregometry. Both groups treated with 20 mg/kg clopidogrel showed a significant impaired aggregation in comparison with untreated controls on day 3 ( $11.7 \pm 2.3$  U [clopidogrel] vs.  $34.0 \pm 13.5$  U [untreated





**Fig. 1.** A digitized image of the respective stained section of the skin was analyzed (cellSens Dimension Olympus, Germany), a predefined frame (ROI = region of interest) was applied (a) and the stained area (light green) was measured inside the area of the frame with predefined settings (b).

control],  $n = 3$  per group,  $p \leq 0.05$ ; and  $14.3 \pm 1.5$  U [everolimus/clopidogrel vs.  $34.0 \pm 13.5$  U [untreated control],  $n = 3$  per group,  $p \leq 0.05$ ) and on day 8 ( $7.0 \pm 0$  U [clopidogrel] vs.  $35.0 \pm 4.2$  U [untreated control],  $n = 3$  per group,  $p \leq 0.01$ ; and  $8.7 \pm 2.1$  U [everolimus/clopidogrel] vs.  $35.0 \pm 4.2$  U [untreated control],  $n = 3$  per group,  $p \leq 0.01$ ). Blood of untreated mice showed unimpaired platelet aggregation and everolimus had no effect on platelet aggregation. These results are in line with our previous findings [12,15] (Fig. 2).

#### 4.2. Clopidogrel and everolimus significantly prolonged survival of mice skin allografts

Altogether 50 animals were transplanted for this experiment. The animals were divided into 5 groups and observed as long as the graft was vivid. Isografts (CBA/J (H-2<sup>k</sup>) into CBA/J (H-2<sup>k</sup>)) survived for over 100 days, while untreated allografts from C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) donors implanted in CBA/J (H-2<sup>k</sup>) recipients were rejected after  $12.8 \pm 2.4$ . All experimental groups either treated with clopidogrel or everolimus or a combination of both drugs showed a significant prolonged skin graft survival (mean survival in days:  $16.6 \pm 2.7$  days [clopidogrel 20 mg/kg = C] vs.  $12.8 \pm 2.4$  days [untreated allograft = Po],  $n = 10$  per group,  $p \leq 0.01$ ;  $18.2 \pm 2.4$  days [everolimus 0.05 mg/kg = E] vs.  $12.8 \pm 2.4$  days [Po],  $n = 10$  per group,  $p \leq 0.01$ ;  $19.7 \pm 5.7$  days [everolimus 0.05 mg/kg + clopidogrel 20 mg/kg = EC] vs.  $12.8 \pm 2.4$  days [Po],  $n = 10$  per group,  $p \leq 0.01$ ). Isografts were entirely integrated

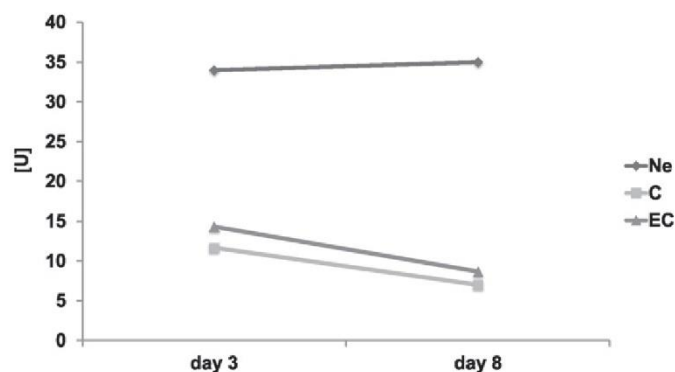
into the skin of the recipient and exhibited no signs of rejection during the complete observation period. However, comparison of the different treatment groups revealed no significant difference in terms of graft survival (Fig. 3).

#### 4.3. Monotherapy with clopidogrel and in combination with everolimus leads to improved survival of microvessels

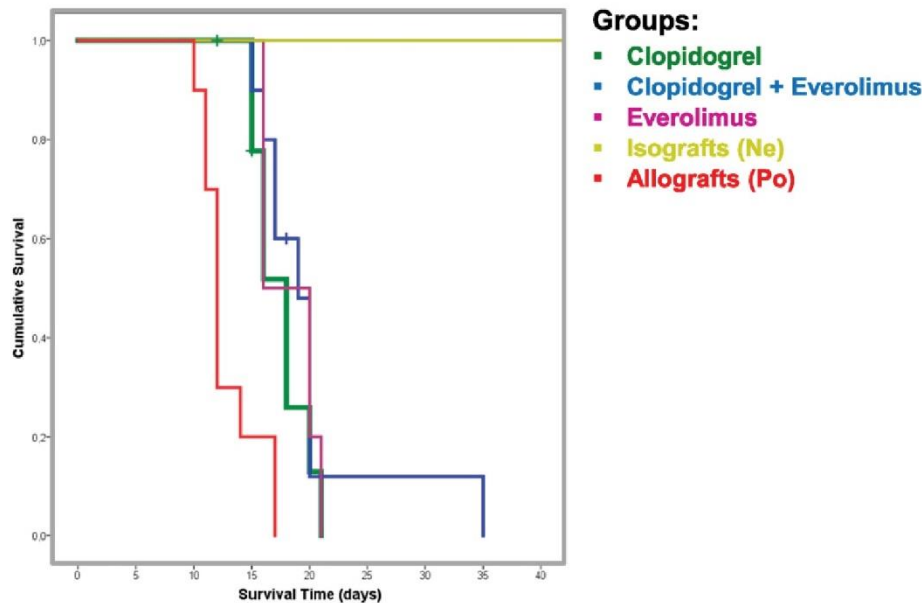
Histologic sections taken at day 8 after transplantation were incubated with anti-CD31, to measure the density of microvessels. Stained sections of grafts from recipients after monotherapy with either clopidogrel (20 mg/kg = C) or everolimus (0.05 mg/kg = E) showed a significant higher amount of CD31 expression ( $1577.7 \pm 200.4$  [C] vs.  $479.7 \pm 184.2$  [Po]  $n = 8$  per group,  $p \leq 0.01$ ; and  $1526.1 \pm 230.0$  [E] vs.  $479.7 \pm 184.2$  [Po]  $n = 8$  per group,  $p \leq 0.01$ ). In addition treatment with everolimus in combination with clopidogrel (EC) resulted in further improved density of CD31 expression within the area of interest ( $1702.8 \pm 151.1$  [EC] vs.  $479.7 \pm 184.2$  [Po]  $n = 8$  per group,  $p \leq 0.01$ ). Syngeneic controls presented a similar level of CD31 signaling ( $2071.9 \pm 494.1$ ) when compared with the most effective therapeutic strategy using a combination of clopidogrel and everolimus (Fig. 4).

#### 4.4. Treatment with clopidogrel alone and in combination with everolimus reduced complement activation

In a next step we wanted to evaluate the effects of our treatment strategy on humoral rejection, as this can also impair microvascular integrity by endothelial activation via complement activation. For this purpose histologic sections of the respective experimental groups were stained with anti-C4d. Skin grafts recovered from animals treated with monotherapy of clopidogrel or everolimus displayed a marked reduction of C4d staining compared to untreated controls ( $420.9 \pm 70.9$  [C] vs.  $772.4 \pm 159.7$  [Po];  $n = 8$  per group;  $p \leq 0.01$ ; and  $493.0 \pm 79.8$  [E] vs.  $772.4 \pm 159.7$  [Po];  $n = 8$  per group;  $p \leq 0.01$ ). Interestingly, a combination of clopidogrel and everolimus demonstrated significant superior reduction of complement deposition as compared to untreated controls ( $324.5 \pm 77.3$  [EC] vs.  $772.4 \pm 159.7$  [Po];  $n = 8$  per group;  $p \leq 0.01$ ) and this strategy was also more effective than clopidogrel or everolimus alone ( $324.5 \pm 77.3$  [EC] vs.  $420.9 \pm 70.9$  [C];  $n = 8$  per group;  $p \leq 0.01$ ; and vs.  $493.0 \pm 79.8$  [E];  $n = 8$  per group;  $p \leq 0.01$ ). Only negligible amounts of C4d could be detected in the isografts ( $62.9 \pm 36.4$ ) (Fig. 5).



**Fig. 2.** Influence of clopidogrel on platelet aggregation. Value of area under the aggregation curve is given in "U". The untreated control (Ne) showed an unchanged ability for aggregation. Platelets of mice treated with clopidogrel (C) as well as in combination with everolimus (EC) were severely and progressively affected ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 3.** The untreated isograft group (Ne) showed no sign of necrosis for over 100 days. The untreated allografts (Po) were rejected most rapidly. Clodipogrel (C) alone and everolimus (E) improved the survival, the combination of everolimus and clodipogrel (EC) achieved the best effect within the treated groups.

## 5. Discussion

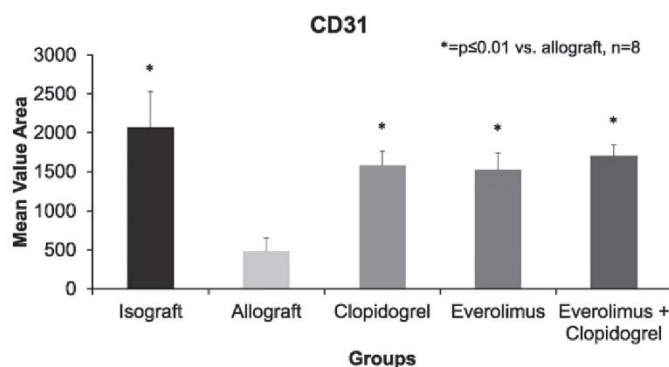
The recipient's alloimmune response after solid organ transplantation results in considerable microvascular damage and is presumably an initiating factor for the development of chronic rejection. Assessment of the microvascular damage within transplanted grafts allows an evaluation of transplant survival before the manifestation of lesions in large vessels [17]. The presence and integrity of a functioning microvascular structure is critical in the maintenance of normal tissue architecture and also a mechanistic link between inflammation and rejection leading to tissue remodeling. Therefore we focused in this study on the microvascular composition within allogeneic murine skin transplants and its impact on graft survival. In addition, we were interested if platelet inhibition with clodipogrel alone or combined with the mTOR-inhibitor everolimus has a beneficial effect on microvascular integrity.

The allogeneic murine skin transplantation is a suitable model to investigate the microvascular structure during an alloimmune response and graft survival mainly depends on functioning microvessels. After skin transplantation the microcirculation is restored rather fast by sprouting of new vessels from the wound bed connecting to existing capillaries around day 5 [18]. Therefore it was decided to analyze grafts on day 8 after transplantation, as at this timepoint, an existing microcirculation was present while there was still no macroscopic sign of

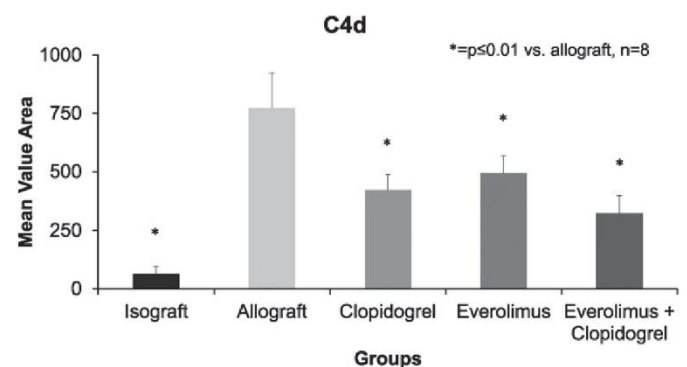
rejection. Secondly, throughout the further course of the experiments rejection of the grafts could be monitored and evaluated.

During wound healing an inflammatory reaction always parallels angiogenesis. A shift of these balanced processes towards the latter one that stimulates the healing response [19]. This fact is supported by a study from Mori and colleagues where TNF-Rp55-deficient (KO) mice had an impaired leukocyte infiltration and thereby a reduced inflammatory response. Those mice exhibited an improved wound healing and angiogenesis [20]. These results come along with our findings as a reduction of the immune response after treatment with clodipogrel, everolimus or a combination of both results in prolonged skin graft survival.

In a transplanted allograft with its highly up regulated inflammation the conditions for healing and restoration of the blood flow are quite poor. Due to extensive beneficial results of clodipogrel as an important therapeutic agent in coronary artery disease [21] as well as our previous findings where we could show that application of clodipogrel drastically reduced the development of transplant arteriosclerosis or the formation of obliterative airway disease (OAD) in murine transplant models [5,12,15] we hypothesized a beneficial effect on the microvascular integrity in transplanted skin allografts. Indeed monotherapy with clodipogrel led to a distinct improved survival of microvessels in skin transplants. Different mechanisms may account for this observation. The hemodynamic



**Fig. 4.** Area with positive signals for CD31 inside the frame. Untreated allografts displayed a significant smaller amount of CD31 in the analyzed slides. Although all treatments showed still less signal than the isografts, the combination of clodipogrel and everolimus improved it most.



**Fig. 5.** Area with positive signals for C4d. Untreated allografts displayed the highest amount of C4d. In contrast to this, isografts showed almost no sign of C4d. The combination of clodipogrel and everolimus were the most effective treatment in the ways of decreasing the C4d-load.



in damaged vessels is heavily compromised through activation and aggregation of platelets [22]. Clopidogrel as a strong P2Y<sub>12</sub>-inhibitor may consequently improve hemodynamics in the skin grafts by enhancing the blood-flow due to inhibition of platelet aggregation. In addition, Willoughby and colleagues pointed out that clopidogrel ameliorates microvascular endothelial function in patients with stable coronary artery disease independent of its effects on ADP-induced platelet aggregation [23]. Further studies emphasized on the inflammation-induced negative effect of reduced vascular nitric oxide (NO) bioavailability and increased oxidative stress on endothelial function [24,25]. NO is an important vasodilator and has anti-thrombotic, anti-inflammatory and anti-platelet effects. Moreover it plays a major role as a regulator of cell migration and angiogenesis [26]. It has been shown that clopidogrel has beneficial effects on NO disposability potentially by blocking abnormal platelet–endothelial interactions during inflammation [27] and by increasing the sensitivity of adenylyl cyclase which is an important enzyme in signal transduction pathways and necessary for the induction of the NO producing endothelial nitric oxide synthase (eNOS) relevant for endothelial integrity [28].

Activated platelets secrete many pro-inflammatory mediators leading to interactions between platelets and endothelial cells. One of the most important factors in these interactions is platelet derived CD40L, which enhances the expression of adhesion molecules on endothelial cells and thereby increases the attachment of monocytes and lymphocytes to the inflamed vascular wall [29,30]. In addition CD40L prevents vascular endothelial growth factor (VEGF) induced endothelial cell (EC) migration and tube formation in vitro and stimulates the production of reactive oxygen species (ROS) by ECs which antagonizes the endothelial NO production [31]. In previous studies we could clearly demonstrate that the monotherapy of clopidogrel reduced the expression of CD40L in different mouse transplant models [5,12] and think that this may also explain the beneficial effects on the microvascular integrity in skin transplants in the present study. Given that CD40L is also expressed by activated T-cells this possibly led to the unexpected enhanced density of microvessels seen in our mouse skin grafts treated with everolimus. In addition everolimus as mTOR-inhibitor acts on the IL-2 mediated T-cell proliferation and may therefore shift the balance between inflammation and angiogenesis towards the latter one. Thus, the combined treatment of everolimus and clopidogrel increased the survival of microvessels in skin allografts in comparison to monotherapy with clopidogrel or everolimus.

An important fact that has to be mentioned is the approved antiproliferative effect of everolimus in cancer angiogenesis: A reduced density of vessels in the tumor formation could be observed after treatment with everolimus in some tumor models [32]. But the immunological aspects surrounding a tumor differ greatly from the strong alloimmune reaction after transplantation. It is also remarkable that the mTOR-inhibitor rapamycin, the archetype of everolimus, increased the level of VEGF depending on the circumstances [33]. The alloimmune environment after skin transplantation may accordingly explain the observed improvements after everolimus treatment.

Antibody-mediated rejection (AMR) in heart transplantation is also associated with cardiac allograft vasculopathy (CAV) and increased graft dysfunction [34]. Vascular damage in this context occurs by allo-antibody induced activation of complement resulting in endothelial cell activation, intravascular platelet aggregation and the release of von Willebrand factor (vWF) and P-selectin [35,36]. Furthermore, several studies found a correlation between AMR and the complement split product C4d deposition in the capillary endothelium [35,37]. Therefore, this aspect was also examined and monotherapy with everolimus led to significant less C4d deposition in skin transplants in comparison to untreated animals. One mechanistic explanation could be that the enhanced production of HLA alloantibodies in this allogenic skin transplant model might not be able to increase the phosphorylation of S6 kinase (S6K) and S6 ribosomal kinase (S6RP) via the activated mTORC1 complex which normally promotes protein synthesis and

growth because of the inhibitory effect of everolimus on mTORC1 [38]. This assumption is supported by data of Jin et al. who showed that everolimus inhibit HLA-I induced mTORC1 formation [39]. Furthermore Lepin and colleagues found a correlation between increased S6RP levels and C4d deposition on microvascular endothelium in addition with circulating donor specific antibodies during AMR in heart allograft recipients [40]. Combined treatment of everolimus and clopidogrel further reduced C4d deposition within the skin grafts in comparison to the application of clopidogrel alone. The fact that complement deposition on endothelial cells results in up-regulation of surface expressed P-selectin, which supports the activation and adhesion of platelets and inflammatory cells [35] could account for this effect. In addition, P-selectin from activated platelets has been identified as an activator of the complement system [41,42] and therefore reduction of P-selectin by clopidogrel [5,43] induced a significant alleviation of C4d deposition in allogenic murine skin transplants. Taken together we think that increased microvascular density and reduced inflammation as manifested by reduced P selectin expression resulted in increased survival of skin grafts.

## 6. Conclusion

In this study we have shown that clopidogrel alone or in combination with everolimus was able to improve the microvascular integrity in an experimental skin transplant model and that this resulted in improved graft survival. Both drugs have been shown to be effective by our group in a variety of different transplant models and an established clinical safety profile. We hope that our data further promote clinical use of this treatment option after heart transplantation.

## Authorship

BM, CH, MW and SME: designed the study. BM, NK, and MR-G: performed the experiments and collected data. BM and SME: analyzed the data. BM, CH, MR-G and SME: wrote the manuscript.

## Funding

This study was supported by grants from the IZKF of the University of Erlangen-Nürnberg and the ADUMED-Foundation.

## Acknowledgments

The authors would like to thank Prof. Stephan von Hoersten and the staff of the animal facility of the University of Erlangen-Nürnberg for their expert care of animals used for this study. We also thank Professor Rauh of the Children's Hospital of the University of Erlangen for his expert technical assistance with the analysis of the platelet aggregation and Dr. Zinser of the Department of Dermatology of the University of Erlangen for her advice on skin transplantation in mice.

## References

- [1] L.H. Lund, L.B. Edwards, A.Y. Kucheryavaya, C. Benden, J.D. Christie, A.I. Dipchand, et al., The registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirty-first official adult heart transplant report-2014; focus theme: retransplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 33 (2014) 996–1008.
- [2] K. Lietz, L.W. Miller, Current understanding and management of allograft vasculopathy, *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 16 (2004) 386–394.
- [3] M. Gawaz, Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium, *Cardiovasc. Res.* 61 (2004) 498–511.
- [4] V. Henn, J.R. Slupsky, M. Grafe, I. Anagnostopoulos, R. Forster, G. Muller-Berghaus, et al., CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, *Nature* 391 (1998) 591–594.
- [5] S. Abele, B.M. Spriewald, M. Ramsperger-Gleixner, M. Wollin, N.E. Hiemann, B. Nieswandt, et al., Attenuation of transplant arteriosclerosis with clopidogrel is associated with a reduction of infiltrating dendritic cells and macrophages in murine aortic allografts, *Transplantation* 87 (2009) 207–216.
- [6] C. Heim, S. Eckl, R. Preidl, M. Ramsperger-Gleixner, N. Koch, K. Goldmann, et al., Delayed therapy with clopidogrel and everolimus prevents progression of



- transplant arteriosclerosis and impairs humoral alloimmunity in murine aortic allografts, *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 47 (2015) 180–187.
- [7] C.S. Committee, A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee, *Lancet* 348 (1996) 1329–1339.
  - [8] S. Yusuf, F. Zhao, S.R. Mehta, S. Chrolavicius, G. Tognoni, K.K. Fox, et al., Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation, *N. Engl. J. Med.* 345 (2001) 494–502.
  - [9] P. Savi, J.M. Pereillo, M.F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J.P. Maffrand, et al., Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel, *Thromb. Haemost.* 84 (2000) 891–896.
  - [10] R.F. Storey, H.M. Judge, R.G. Wilcox, S. Heptinstall, Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin, *Thromb. Haemost.* 88 (2002) 488–494.
  - [11] S. Eckl, C. Heim, S. Abele-Ohl, J. Hoffmann, M. Ramsperger-Gleixner, M. Weyand, et al., Combination of clopidogrel and everolimus dramatically reduced the development of transplant arteriosclerosis in murine aortic allografts, *Transpl. Int.* 23 (2010) 959–966.
  - [12] R.H. Preidl, S. Eckl, M. Ramsperger-Gleixner, N. Koch, B.M. Spriewald, M. Weyand, et al., Clopidogrel reduces post-transplant obliterative bronchiolitis, *Transpl. Int.* (2013).
  - [13] A.N. Babu, T. Murakawa, J.M. Thurman, E.J. Miller, P.M. Henson, M.R. Zamora, et al., Microvascular destruction identifies murine allografts that cannot be rescued from airway fibrosis, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 3774–3785.
  - [14] R.E. Billingham, P.B. Medawar, The technique of free skin grafting in mammals, *J. Exp. Biol.* 28 (1951) 385–402.
  - [15] S. Abele, M. Weyand, M. Wollin, N.E. Hiemann, F. Harig, T. Fischlein, et al., Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 131 (2006) 1161–1166.
  - [16] O. Toth, A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy, W. Siess, Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood, *Thromb. Haemost.* 96 (2006) 781–788.
  - [17] N.E. Hiemann, E. Wellenhofer, C. Knosalla, H.B. Lehmkuhl, J. Stein, R. Hetzer, et al., Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: evidence from 9713 endomyocardial biopsies, *Circulation* 116 (2007) 1274–1282.
  - [18] N. Lindenblatt, M. Calcagni, C. Contaldo, M.D. Menger, P. Giovanoli, B. Vollmar, A new model for studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis, *Plast. Reconstr. Surg.* 122 (2008) 1669–1680.
  - [19] J.R. Jackson, M.P. Seed, C.H. Kircher, D.A. Willoughby, J.D. Winkler, The codependence of angiogenesis and chronic inflammation, *FASEB J.* 11 (1997) 457–465.
  - [20] R. Mori, T. Kondo, T. Ohshima, Y. Ishida, N. Mukaida, Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration, *FASEB J.* 16 (2002) 963–974.
  - [21] S.A. Harding, K.A. Fox, Clopidogrel in coronary artery disease, *Br. J. Cardiol.* 9 (supplement 8) (2002) S8–S12.
  - [22] Z.M. Ruggeri, Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 1335–1342.
  - [23] S.R. Willoughby, L.J. Luu, J.D. Cameron, A.J. Nelson, C.D. Schultz, S.G. Worthley, et al., Clopidogrel improves microvascular endothelial function in subjects with stable coronary artery disease, *Heart Lung Circ.* 23 (2014) 534–541.
  - [24] D. Behrendt, P. Ganz, Endothelial function. From vascular biology to clinical applications, *Am. J. Cardiol.* 90 (2002) 40L–48L.
  - [25] B.R. Clapp, A.D. Hingorani, R.K. Kharbanda, V. Mohamed-Ali, J.W. Stephens, P. Vallance, et al., Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress, *Cardiovasc. Res.* 64 (2004) 172–178.
  - [26] L. Lamallice, F. Le Boeuf, J. Huot, Endothelial cell migration during angiogenesis, *Circ. Res.* 100 (2007) 782–794.
  - [27] T. Heitzer, V. Rudolph, E. Schwedhelm, M. Karstens, K. Sydow, M. Ortak, et al., Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 1648–1652.
  - [28] A. Schafer, D. Fraccarollo, S. Pfortsch, E. Loch, J. Neuser, C. Vogt, et al., Clopidogrel improves endothelial function and NO bioavailability by sensitizing adenylyl cyclase in rats with congestive heart failure, *Basic Res. Cardiol.* 106 (2011) 485–494.
  - [29] M. Gawaz, H. Langer, A.E. May, Platelets in inflammation and atherogenesis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 3378–3384.
  - [30] C.N. Morrell, H. Sun, A.M. Swaim, W.M. Baldwin III, Platelets an inflammatory force in transplantation, *Am. J. Transplant.* 7 (2007) 2447–2454.
  - [31] C. Urbich, E. Dernbach, A. Aicher, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species, *Circulation* 106 (2002) 981–986.
  - [32] H.A. Lane, J.M. Wood, P.M. McSheehy, P.R. Allegrini, A. Boulay, J. Brueggen, et al., mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 1612–1622.
  - [33] Y. Liu, Q. Zheng, H. Wu, X. Guo, J. Li, S. Hao, Rapamycin increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A through ERK under normoxia, *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 45 (2013) 259–267.
  - [34] J. Kobashigawa, M.G. Crespo-Leiro, S.M. Ensminger, H. Reichenspurner, A. Angelini, G. Berry, et al., Report from a consensus conference on antibody-mediated rejection in heart transplantation, *J. Heart Lung Transplant.* 30 (2011) 252–269.
  - [35] W.M. Baldwin III, Z. Qian, H. Ota, M. Samaniego, B. Wasowska, F. Sanfilippo, et al., Complement as a mediator of vascular inflammation and activation in allografts, *J. Heart Lung Transplant.* 19 (2000) 723–730.
  - [36] K. Murata, T. Iwata, S. Nakashima, K. Fox-Talbot, Z. Qian, D.S. Wilkes, et al., C4d deposition and cellular infiltrates as markers of acute rejection in rat models of orthotopic lung transplantation, *Transplantation* 86 (2008) 123–129.
  - [37] M.G. Crespo-Leiro, A. Veiga-Barreiro, N. Domenech, M.J. Paniagua, P. Pinon, M. Gonzalez-Cuesta, et al., Humoral heart rejection (severe allograft dysfunction with no signs of cellular rejection or ischemia): incidence, management, and the value of C4d for diagnosis, *Am. J. Transplant.* 5 (2005) 2560–2564.
  - [38] X. Zhang, E.F. Reed, Effect of antibodies on endothelium, *Am. J. Transplant.* 9 (2009) 2459–2465.
  - [39] Y.P. Jin, N.M. Valenzuela, M.E. Ziegler, E. Rozengurt, E.F. Reed, Everolimus inhibits anti-HLA I antibody-mediated endothelial cell signaling, migration and proliferation more potently than sirolimus, *Am. J. Transplant.* 14 (2014) 806–819.
  - [40] E.J. Lepin, Q. Zhang, X. Zhang, P.T. Jindra, L.S. Hong, P. Ayele, et al., Phosphorylated S6 ribosomal protein: a novel biomarker of antibody-mediated rejection in heart allografts, *Am. J. Transplant.* 6 (2006) 1560–1571.
  - [41] I. Del Conde, M.A. Cruz, H. Zhang, J.A. Lopez, V. Afshar-Kharghan, Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 871–879.
  - [42] E.I. Peerschke, B. Andemariam, W. Yin, J.B. Bussel, Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura, *Br. J. Haematol.* 148 (2010) 638–645.
  - [43] U. Klinkhardt, R. Bauersachs, J. Adams, J. Graff, E. Lindhoff-Last, S. Harder, Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease, *Clin. Pharmacol. Ther.* 73 (2003) 232–241.

### **3. Diskussion**

#### **3.1 Hauttransplantation als Modell**

Für die Erforschung der Transplantatabstoßung solider Organe inklusive der chronischen Abstoßung existieren mittlerweile mehrere Modelle, so dient z.B. die Aortentransplantation als Modell für die Herztransplantation oder die Tracheentransplantation für die Lunge. Die Transplantation von Haut stellt jedoch für die Forschung eine besondere Herausforderung dar, da die Abstoßung relativ schnell und deutlich vonstattengeht. So konnten wir in Vorversuchen zeigen, dass die transplantierten Hautstücke im Schnitt nach 12 Tagen abgestoßen wurden. Zudem wird das Graft-eigene Gefäßsystem ab Tag 5 postOP mit den Gefäßen des Empfängers verbunden [47] und steht so in Kontakt mit allen relevanten Zellen des Immunsystems.

Um eine möglichst deutliche Abstoßung zu provozieren, wurden zwei Mausstämme verwendet, die sich in Bezug auf ihre MHC I-Hauptgene maximal unterscheiden. Somit dienten C57BL/6 mit dem Haplotyp H2-K<sup>b</sup>, H2-L<sup>b</sup> und H2-D<sup>b</sup> (kurz: H2-b) als Spender und CBA, die H2-K<sup>k</sup>, H2-L<sup>k</sup> und H2-D<sup>k</sup> (kurz: H2-k) exprimieren, als Empfänger.

##### **3.1.1 Durchführung**

Die Hauttransplantation bei der Maus wurde ausführlich von Billingham und Medawar beschrieben [48], wir haben sie jedoch an das Studiendesign angepasst und wie folgt durchgeführt.

Die Spender-Maus vom Typ C57BL/6 wurde schmerzfrei getötet und die Haut vom Schwanz präpariert. Dazu wurde die Haut zirkulär an der Schwanzbasis eingeschnitten, gefolgt von einem longitudinalen Schnitt auf der ventralen Seite des Schwanzes. Nachdem die Haut an dem cranialen Ende von der Unterlage gelöst wurde, kann das Hautstück mit einer Pinzette durch konstanten Zug abgezogen werden. Bis zur weiteren Verwendung wird das

---

Transplantat zwischen Tupfern gelagert, die mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet wurden.

Die Transplantation wird im dorsolateralen Brustkorb vorgenommen, da dieser Bereich sowohl über eine relativ locker sitzende Haut verfügt und sich zudem relativ leicht beobachten lässt. Das Wundbett der Empfänger-Maus vom Typ CBA/J wird wie folgt vorbereitet: um die Heilung nicht unnötig zu stören wird der OP-Bereich rasiert. Anschließend wird ein Stück Klebeband, in das ein ca. 1 cm<sup>2</sup> Fenster geschnitten wurde, aufgeklebt, um ein unnötiges Verziehen der Haut während der Heilungsphase zu verhindern. Die Haut in diesem Rahmen wird vorsichtig mit einer Pinzette angehoben und die entstandene Hautfalte mit einem Scherenschlag entfernt. Die Ränder werden nun mit der Schere präpariert, um ein annähernd quadratisches Wundbett zu erhalten. Aus dem bereitliegenden Transplantat wird ein passendes Stück herausgeschnitten und behutsam mit den Pinzetten in das Wundbett gelegt. Zur Vereinfachung der späteren Beobachtung wird darauf geachtet, dass die Ausrichtung der Haare auf dem Transplantat um 90° oder 180° zur Körperachse gedreht ist (s. Abb 2). Das Transplantat wird abschließend mit einem kleinen Stück Gaze bedeckt und mit Klebeband fixiert. Die Bandage wird am achten Tag postOP entfernt und die Heilung beurteilt.





**Abb. 2 Maus nach erfolgter Hauttransplantation**

Das Graft wurde in das vorbereitete Wundbett eingepasst und das Tape verhindert eine Verziehen der Ränder

### **3.1.2 Applikation der Medikamente**

Sowohl Clopidogrel als auch Everolimus werden im humanmedizinischen Gebrauch als Tabletten verabreicht. Dies ist bei Mäusen aufgrund der vergleichsweise geringen Menge nur schwer nachzustellen. Auch eine orale Applikation über das Trinkwasser wurde ausgeschlossen, da auf diese Weise keine genaue Dosierung erfolgen kann.

Nachdem wir bei vergangenen Experimenten gute Erfahrung mit intraperitonealen Injektionen der genannten Medikamente gemacht haben [45, 46, 49], wurde diese Form der Applikation bei diesem Versuchsaufbau beibehalten. Um etwaige Dosierungsabweichungen zu vermeiden, wurden die Lösungen täglich frisch zubereitet, indem die Tabletten fein zerkleinert und

mit 0,9 %iger Kochsalzlösung auf die entsprechende Konzentration verdünnt wurden.

### **3.2 Thrombozyten-Hemmung**

Da ein wesentlicher Bestandteil unserer Hypothese auf einer effektiven Hemmung der Thrombozyten beruhte, wurden die aggregationshemmenden Eigenschaften von Clopidogrel allein und in Kombination mit Everolimus in einem eigenen Experiment bestätigt. Im Unterschied zu früheren Analysen [46, 49] konnten wir hier auf einen Multiplate® analyzer der Firma Roche (Schweiz) zurückgreifen. Bei dieser Methode entfällt die aufwendige Herstellung von Thrombozytenreichen Plasma, da für den Multiplate® analyzer das Blut direkt verwendet werden kann. Dabei wurde die Tiere in zwei Behandlungs- und eine Kontrollgruppe aufgeteilt. Die Behandlungsgruppen erhielten acht Tage lang jeweils 20 mg/kg Clopidogrel bzw. 20 mg/kg Clopidogrel plus 0,05 mg/kg Everolimus, die Kontrollgruppen dagegen blieb unbehandelt. An Tag 3 und an Tag 8 wurde jeweils Blut entnommen und mittels „multiple electrode aggregometry“ in der Methode von Tóth et al. [50] die Thrombozyten-Aggregation gemessen. Die Gruppen, die mit 20 mg/kg Clopidogrel behandelt worden waren (Sowohl allein als auch in Kombination mit Everolimus), zeigten an beiden Messpunkten eine deutlich verminderte Aggregation der Thrombozyten, während Tiere, die nur Everolimus verabreicht bekommen hatten, ebenso wie die unbehandelten Kontrolltiere unveränderte Werte aufwiesen. (Manuskript Abb. 2)

### **3.3 Kapillarsystem**

Von den kleinen Gefäßen sind vor allem die Kapillare von besonderer Bedeutung für die Versorgung der Organe wie auch der Haut. Treten in diesen Bereichen durch Entzündungs- und Abstoßungsprozesse Schäden auf, können diese langfristige Folgen wie Nekrosen nach sich ziehen. Auch wenn

die Konsequenzen nicht sofort ersichtlich sind, gibt es auch Untersuchungen, in den das Ausmaß der Schäden an dem Kapillarsystem eine Prognose für das Transplant zulässt [51]. In dieser Studie von Hiemann et al. wurden von 873 Herztransplantations-Patienten im ersten Jahr nach der OP mehrere Herzbiopsien entnommen und histologisch auf Anzeichen von Mikrovaskulopathien untersucht. Die Ergebnisse der histologischen Analysen wurden dann mit den Überlebensraten der Patienten in Verbindung gebracht. Dabei wurde ersichtlich, dass das Auftreten von stenotischen Mikrovaskulopathien im Zeitraum von weniger als 30 Tage postOP bzw. zwischen dem 270. und 365. Tag postOP, eine ungünstigere Prognose zur Folge hatte. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam ein paar Jahre später auch Revelo et al. [52], die bei Patienten mit schlechterem Outcome im Zusammenhang mit der Antikörper-vermittelten Abstoßung nach Herztransplantation eine geringere Dichte an Mikrogefäßen fanden.

### **3.4 Wundheilung als entzündlicher Prozess**

Nach dem Ereignis einer Verletzung treten mehrere Prozesse auf, die in einander greifen und sich unterstützen. Als Erstreaktion sorgen die Thrombozyten für ein Stoppen der Blutung und bereiten den Ort des Geschehens für folgende Phasen vor. Die ausgeschütteten Zytokine der Thrombozyten und des verletzten Gewebes locken Entzündungszellen an und die Wundheilung geht von der Phase der Hämostasis zur Entzündung über. An erster Stelle stehen dabei neutrophile Granulozyten und Makrophagen, die eine Säuberung des Gebiets von potentiellen Krankheitserregern und abgestorbenen Zellteilen vornehmen. Vor allem Makrophagen scheinen dabei ein essentieller Bestandteil der physiologischen Wundheilung zu sein, da das Fehlen von Makrophagen zu einer Störung der selbigen führt. So phagozytieren die Makrophagen nicht nur Zelltrümmer und Bakterien sondern sorgen auch für ein kontrolliertes Ende der Entzündung [53].

Unter dem Einfluss wachstumsfördernder Zytokine – allen voran VEGF-A – folgt nun die Phase der Proliferation. Gewebedefekte werden durch Teilung der umliegenden Zellen gefüllt und Blutgefäße sprossen in das Gebiet ein. Am Ende der Wundheilung stehen die Reifung der neuen Zellen und der vollständige Verschluss des entstandenen Defekts.

Somit können zwei parallele ablaufende Prozesse beobachtet werden, da bei der Wundheilung neben der Entzündung eine Angiogenese stattfindet. Hierbei ist eine gewisse Balance zwischen diesen beiden Vorgängen gefordert, auch wenn eine Tendenz in Richtung Angiogenese förderlich für die Wundheilung ist [54]. In einem Versuch zeigten Mäusen mit TNF-Rp55-Knockout eine erhebliche bessere Angiogenese und infolgedessen auch eine verbesserte Wundheilung [55]. Durch das Fehlen dieses TNF-Rezeptors infiltrieren weniger Leukozyten den Ort der Schädigung und es kommt zu einer geringeren Entzündung. Andererseits scheint aber der Mangel an bestimmten Entzündungsmediatoren wiederum die Heilung zu verlangsamen [56].

Während die Heilung nach einer Transplantation normalerweise günstig verläuft, sind die Gefäße des transplantierten Organs nach Anschluss an den Kreislauf des Spenders in konstantem Kontakt mit dem Immunsystem. Folglich sind die Endothelzellen fortwährend einer entzündlichen Reaktion ausgesetzt, was die oben angesprochene Balance empfindlich stören und letztendlich mit verantwortlich für die chronische Abstoßung sein kann. Gerade die mikrovaskulären Strukturen sind dabei besonders betroffen, da hier kleine Veränderungen zu einer Verlegung der Gefäße und anschließend zu einer Hypoxie des Gewebes führen können, was die Entzündungsreaktionen weiter verstärken kann. Dieser Zusammenhang zwischen der Integrität dieser Kleinstgefäße und einer späteren chronischen Abstoßung konnte bisher unter anderem nach Lungentransplantationen [57] und in einem Herztransplantationsmodell bei der Ratte [58] beobachtet werden.

### **3.5 Wirkung von Clopidogrel bzw. Everolimus auf die Abstoßung**

Da Entzündung und Revaskularisation äußerst eng miteinander verknüpft sind und ein funktionsfähiges Gefäßsystem einen entscheidenden Einfluss auf ein Transplantat hat, ist es sehr wahrscheinlich, dass eine Immunsuppression sich somit nicht nur positiv auf die Abstoßung auswirkt, sondern dass sie auch in gewissem Rahmen die Heilung an sich unterstützt, was wiederum die Abstoßungsreaktionen mindert. Durch die Anwendung von Clopidogrel und Everolimus greift man dabei an zwei verschiedenen Punkten ein.

Clopidogrel sorgt dabei für eine effektive Hemmung der Thrombozyten und kann an mehreren Fronten Verbesserungen beitragen. Die durch die Operation beschädigten Gefäße führen zu einer massiven Thromben-Bildung, die nachfolgende Gefäße verstopfen könnten. Durch Clopidogrel wird nun eine übermäßige Aggregation der Thrombozyten verhindert und so die Hämodynamik verbessert. Wichtiger in diesem Zusammenhang jedoch sind die Eigenschaften von Thrombozyten als Teil des Immunsystems, da sie nach ihrer Aktivierung viele entzündungsfördernde Zytokine ausschütten [59]. So trägt Clopidogrel dazu bei, die entzündlichen Prozesse nach einer Transplantation einzudämmen und die Gefahr einer chronischen Abstoßung zu verringern [44-46]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang auch, dass aktivierte Thrombozyten über P-Selektin das Komplementsystem aktivieren können [60]. Komplement-Ablagerungen an Endothelzellen hingegen führen zu einer erhöhten Präsentation von P-Selektin der Endothelzellen und somit einer verstärkten Aktivierung von Thrombozyten [19]. Dieser sich selbst verstärkende Vorgang wird durch eine Hemmung der Thrombozyten durchbrochen, was sich in den reduzierten Komplementnachweisen in der Gruppe, die mit Clopidogrel behandelt wurde, zeigte.

Everolimus hingegen greift vor allem von Seiten der T-Zellen in das entzündliche Geschehen ein. Hierbei führt die Verringerung des Entzündungs-Levels aufgrund der verminderten Anwesenheit und Aktivität von T-Zellen neben einer verbesserten Heilung zu einem Erhalt der Endothelzellen sowie der Mikrogefäße. Als Kontrapunkt kann angeführt werden, dass Everolimus bei

der Therapie solider Tumore zur Anwendung kommt, da in verschiedenen Tumormodellen eine antiproliferative Wirkung in Bezug auf die Angiogenese in dem Tumorgewebe beobachtet werden konnte [61]. Dies kann durchaus auf die unterschiedliche Zusammensetzung an Zytokinen im Umfeld des Tumors im Vergleich zu einer Entzündung im Rahmen einer nicht vollständig kompatiblen Transplantation zurückgeführt werden. Denn interessanterweise konnte für Rapamycin einer Erhöhung des VEGF-A-Spiegels nachgewiesen werden [62], was sich somit wieder positiv auf das mikrovaskuläre Gefäßsystems des Transplantats auswirken kann.

Von diesen Einflüssen auf das mikrovaskuläre System abgesehen, muss auch die direkte Wirkung auf die T-Zellen und wahrscheinlich auch die B-Zellen beachtet werden, denn Everolimus konnte nachweislich die Entwicklung einer chronischen Abstoßung im Mausmodell verringern [45, 63]. Des Weiteren reduziert Everolimus effektiv die Schädigung der Gefäße durch HLA-Antikörper [64], welche nicht nur bei Hauttransplantaten einen erheblichen Einfluss auf die Abstoßung und letztendlich das Überleben des Transplantats haben [65].

### **3.6 Zusammenfassung und Ausblick**

Im Rahmen der Versuche konnte ein positiver Effekt von Clopidogrel und Everolimus, sowohl jeweils als Monotherapie als auch in Kombination, auf die Ausprägung an Mikrogefäßen in einem Hauttransplantat nachgewiesen werden. So zeigte sich mit immunhistologischen Methoden am Tag 8 postOP im Vergleich zu den unbehandelten Kontrolltieren in den Transplantaten eine deutlich höhere Dichte an Endothelmarker CD31.

Neben diesem Befund konnte auch eine signifikant längere Überlebensdauer der transplantierten Hautstücke nach der Gabe von Clopidogrel und/oder Everolimus beobachtet werden. Während das Graft in der Kontrollgruppe durchschnittlich nur 12 Tage überlebte, blieb es in den behandelten Gruppen im Schnitt über 16 Tage vital, in der Gruppe, die mit Clopidogrel und Everolimus behandelt wurden, größtenteils sogar über 20 Tage. Leider kam keine Gruppe an die Tiere mit Isografts heran, bei denen auch nach 100 Tagen keine Abstoßung ersichtlich war. So kann man davon ausgehen, dass wahrscheinlich noch andere Mechanismen an der Abstoßung der Hauttransplantate beteiligt sind, in diesen Versuchen aber schon deutliche Fortschritte erzielt werden konnten.

Für Clopidogrel wie auch Everolimus wurden in der Vergangenheit anti-inflammatorische Eigenschaften nachgewiesen. Darüber hinaus tragen beide Wirkstoffe neben ihrer indirekten Wirkung über die Entzündungshemmung auch direkt zu einer verbesserten Angiogenese bei. Daher versprechen diese Medikamente interessante Therapiemöglichkeiten, um Patienten nach einer Transplantation eine längere Zeit ohne Abstoßungsreaktionen zu gewähren. Eventuell ist es auch einmal in Kombination mit weiteren Wirkstoffen möglich, die komplexen Vorgänge der Abstoßung vollständig zu unterdrücken und eine Toleranz der Transplantate herbeizuführen.

## 4. Zusammenfassung

Transplantierte Organe benötigen eine zuverlässige Versorgung über das Gefäßsystem. Daher richtet diese Studie ihr Augenmerk darauf, ob eine Hemmung von Thrombozyten, sowohl allein als auch in Kombination mit einem mTOR-Hemmer, einen positiven Effekt auf die Ausprägung der mikrovaskulären Struktur in Hauttransplantaten bei einem allogenen Mausmodell hat. Für die Hauttransplantation wurde die Haut von C57BL6 (H-2b) als Spendertiere auf CBA/J(H-2k) Mäuse übertragen. Auf diese Weise wurde eine vollständige MHC-Inkompatibilität erreicht. Nach der Transplantation wurden die Empfängertiere in mehrere Gruppen aufgeteilt und dann jeweils entsprechend der Gruppe mit Clopidogrel bzw. Everolimus als Monotherapie oder mit beiden Wirkstoffen kombiniert behandelt. In Folge wurde zum einen das Überleben der Hauttransplantate beurteilt. Zum anderen wurden sie am achten Tag postOP entnommen und anschließend immuno-histochemisch auf CD31 und C4d untersucht. Bei den Transplantaten von unbehandelten Mäusen wurde eine geringere Menge von CD31 nachgewiesen werden, während die C4d-Level erhöht waren. Als Vergleich dienten Hautstücke, die innerhalb der Inzuchtrasse transplantiert worden waren. Die Ergebnisse aus den behandelten Gruppen waren signifikant besser, sowohl in Bezug auf CD31 [ $1577.7 \pm 200.4$  (Clopidogrel)/ $1702.8 \pm 151.1$  (Clopidogrel + Everolimus) vs.  $479.7 \pm 184.2$  (Kontrolle),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ] als auch auf C4d [ $420.9 \pm 70.9$  (Clopidogrel)/ $324.5 \pm 77.3$  (Clopidogrel + Everolimus) vs.  $772.4 \pm 159.7$  (Kontrolle),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ]. Darüber hinaus waren die Transplantate der behandelten Tiere signifikant länger vital als die der Hautstücke der Kontrolltiere [ $19.2 \pm 4.2$  d vs.  $12.8 \pm 2.4$  d,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ]. Damit konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel als Monotherapie und auch in Kombination mit Everolimus die mikrovaskuläre Struktur wesentlich verbessern und die Überlebenszeit der Hauttransplantate verlängern konnte.



## 5. Summary

Every transplanted organ relies on a reliable and sound vascular system. Therefore, this study focused on the investigation if platelet inhibition alone or combined with mTOR-inhibition has a beneficial effect on the microvascular integrity in allogeneic murine skin grafts.

Skin transplantation was performed from fully MHC-mismatched C57BL/6 (H-2b) donors to CBA/J(H-2k) recipient mice. Skin allograft recipients were assigned to several experimental groups and either treated with clopidogrel alone, everolimus alone or a combination of both. Graft survival was evaluated and transplants were harvested after 8 days and analyzed for CD31 and C4d by immunohistochemistry.

Untreated allografts showed a reduced amount of CD31 on postoperative day 8 as well as an increase in C4d compared to isografts. All treated animals showed a significant improvement regarding CD31 [ $1577.7 \pm 200.4$  (clopidogrel)/ $1702.8 \pm 151.1$  (clopidogrel + everolimus) vs.  $479.7 \pm 184.2$  (control),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ] and C4d [ $420.9 \pm 70.9$  (clopidogrel)/ $324.5 \pm 77.3$  (clopidogrel + everolimus) vs.  $772.4 \pm 159.7$  (control),  $n = 8$ ,  $p < 0.05$ ]. In addition, skin grafts of animals treated with clopidogrel and everolimus survived significantly longer compared to untreated controls [ $19.2 \pm 4.2$  d vs.  $12.8 \pm 2.4$  d,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ].

In this study we could show that clopidogrel alone and in combination with everolimus substantially improved microvascular integrity and resulted in increased survival time of skin grafts.

## 6. Literatur

1. Gibson, T. and P.B. Medawar, *The fate of skin homografts in man*. J Anat, 1943. **77**(Pt 4): p. 299-310 4.
2. Merrill, J.P., et al., *Successful homotransplantation of the human kidney between identical twins*. Journal of the American Medical Association, 1956. **160**(4): p. 277-282.
3. Mathe, G., E.D. Thomas, and J.W. Ferrebee, *The restoration of marrow function after lethal irradiation in man: a review*. Transplant Bull, 1959. **6**: p. 407-9.
4. Slavin, S., et al., *Long-term survival of skin allografts in mice treated with fractionated total lymphoid irradiation*. Science, 1976. **193**(4259): p. 1252-4.
5. Billingham, R.E., P.L. Krohn, and P.B. Medawar, *Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits*. Br Med J, 1951. **1**(4716): p. 1157-63.
6. Ashwell, J.D., F.W. Lu, and M.S. Vacchio, *Glucocorticoids in T cell development and function\**. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 309-45.
7. Perretti, M. and A. Ahluwalia, *The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids*. Microcirculation, 2000. **7**(3): p. 147-61.
8. Starzl, T.E., T.L. Marchioro, and W.R. Waddell, *The Reversal of Rejection in Human Renal Homografts with Subsequent Development of Homograft Tolerance*. Surg Gynecol Obstet, 1963. **117**: p. 385-95.
9. Maltzman, J.S. and G.A. Koretzky, *Azathioprine: old drug, new actions*. J Clin Invest, 2003. **111**(8): p. 1122-4.
10. Matsuda, S. and S. Koyasu, *Mechanisms of action of cyclosporine*. Immunopharmacology, 2000. **47**(2-3): p. 119-25.
11. Calne, R., *Cyclosporine as a milestone in immunosuppression*. Transplant Proc, 2004. **36**(2 Suppl): p. 13S-15S.
12. Klotz, S., et al., *[Surgical therapy of end-stage heart failure. State of the art 2006]*. Herz, 2006. **31**(5): p. 445-54.
13. Lucey, M.R., et al., *Long-term management of the successful adult liver transplant: 2012 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the American Society of Transplantation*. Liver Transpl, 2013. **19**(1): p. 3-26.
14. Stehlik, J., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th official adult heart transplant report--2012*. J Heart Lung Transplant, 2012. **31**(10): p. 1052-64.
15. Kenneth, M.M., et al., *Janeway Immunologie*, ed. C. Janeway and M.A.k.N. Ehrenstein. 2014, Berlin [u.a.] ; Berlin {[u. a.] : Springer Spektrum ; Springer Spektrum.
16. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4183-94.

17. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 498-511.
18. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
19. Baldwin, W.M., 3rd, et al., *Complement as a mediator of vascular inflammation and activation in allografts*. The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation, 2000. **19**(8): p. 723-30.
20. Barak, O., J.R. Treat, and W.D. James, *Antimicrobial peptides: effectors of innate immunity in the skin*. Adv Dermatol, 2005. **21**: p. 357-74.
21. Lambers, H., et al., *Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora*. Int J Cosmet Sci, 2006. **28**(5): p. 359-70.
22. Herrera, O.B., et al., *A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells*. J Immunol, 2004. **173**(8): p. 4828-37.
23. Weis, M. and W. von Scheidt, *Coronary artery disease in the transplanted heart*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 81-100.
24. Lietz, K. and L.W. Miller, *Current understanding and management of allograft vasculopathy*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **16**(4): p. 386-94.
25. Kirk, A.D., C.N. Morrell, and W.M. Baldwin, 3rd, *Platelets influence vascularized organ transplants from start to finish*. Am J Transplant, 2009. **9**(1): p. 14-22.
26. Risau, W., *Mechanisms of angiogenesis*. Nature, 1997. **386**(6626): p. 671-4.
27. Adair, T.H. and J.P. Montani, *Angiogenesis*, in Angiogenesis. 2010: San Rafael (CA).
28. Distler, J.H., et al., *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. Q J Nucl Med, 2003. **47**(3): p. 149-61.
29. Hechler, B., M. Cattaneo, and C. Gachet, *The P2 receptors in platelet function*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31**(2): p. 150-61.
30. Savi, P., et al., *Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel*. Thromb Haemost, 2000. **84**(5): p. 891-6.
31. Storey, R.F., et al., *Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y12 receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin*. Thromb Haemost, 2002. **88**(3): p. 488-94.
32. Baker, H., et al., *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. III. In vitro and in vivo evaluation*. J Antibiot (Tokyo), 1978. **31**(6): p. 539-45.
33. Sehgal, S.N., H. Baker, and C. Vezina, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 727-32.
34. Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal, *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle*. J Antibiot (Tokyo), 1975. **28**(10): p. 721-6.
35. Abraham, R.T. and G.J. Wiederrecht, *Immunopharmacology of rapamycin*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 483-510.

36. Sehgal, S.N., et al., *Rapamycin: a novel immunosuppressive macrolide*. Med Res Rev, 1994. **14**(1): p. 1-22.
37. Dumont, F.J. and Q. Su, *Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin*. Life Sci, 1996. **58**(5): p. 373-95.
38. Kirchner, G.I., I. Meier-Wiedenbach, and M.P. Manns, *Clinical pharmacokinetics of everolimus*. Clin Pharmacokinet, 2004. **43**(2): p. 83-95.
39. Andoh, T.F., et al., *Comparison of acute rapamycin nephrotoxicity with cyclosporine and FK506*. Kidney Int, 1996. **50**(4): p. 1110-7.
40. Arriola Apelo, S.I., et al., *Alternative rapamycin treatment regimens mitigate the impact of rapamycin on glucose homeostasis and the immune system*. Aging Cell, 2016. **15**(1): p. 28-38.
41. Eisen, H.J., et al., *Everolimus for the prevention of allograft rejection and vasculopathy in cardiac-transplant recipients*. N Engl J Med, 2003. **349**(9): p. 847-58.
42. Rothenburger, M., et al., *Calcineurin inhibitor-free immunosuppression using everolimus (Certican) in maintenance heart transplant recipients: 6 months' follow-up*. J Heart Lung Transplant, 2007. **26**(3): p. 250-7.
43. Valantine, H. and A. Zuckermann, *From clinical trials to clinical practice: an overview of Certican (everolimus) in heart transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2005. **24**(4 Suppl): p. S185-90; discussion S210-1.
44. Abele, S., et al., *Attenuation of transplant arteriosclerosis with clopidogrel is associated with a reduction of infiltrating dendritic cells and macrophages in murine aortic allografts*. Transplantation, 2009. **87**(2): p. 207-16.
45. Eckl, S., et al., *Combination of clopidogrel and everolimus dramatically reduced the development of transplant arteriosclerosis in murine aortic allografts*. Transpl Int, 2010. **23**(9): p. 959-66.
46. Preidl, R.H., et al., *Clopidogrel reduces post-transplant obliterative bronchiolitis*. Transpl Int, 2013.
47. Lindenblatt, N., et al., *A new model for studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis*. Plast Reconstr Surg, 2008. **122**(6): p. 1669-80.
48. Billingham, R.E. and P.B. Medawar, *THE TECHNIQUE OF FREE SKIN GRAFTING IN MAMMALS*. J Exp Biol, 1951. **28**: p. 385-402.
49. Abele, S., et al., *Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(5): p. 1161-6.
50. Toth, O., et al., *Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood*. Thromb Haemost, 2006. **96**(6): p. 781-8.
51. Hiemann, N.E., et al., *Prognostic impact of microvasculopathy on survival after heart transplantation: evidence from 9713 endomyocardial biopsies*. Circulation, 2007. **116**(11): p. 1274-82.
52. Revelo, M.P., et al., *Longitudinal evaluation of microvessel density in survivors vs. nonsurvivors of cardiac pathologic antibody-mediated rejection*. Cardiovasc Pathol, 2012. **21**(6): p. 445-54.
53. Koh, T.J. and L.A. DiPietro, *Inflammation and wound healing: the role of the macrophage*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e23.

- 
54. Jackson, J.R., et al., *The codependence of angiogenesis and chronic inflammation*. FASEB J, 1997. **11**(6): p. 457-65.
  55. Mori, R., et al., *Accelerated wound healing in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice with reduced leukocyte infiltration*. FASEB J, 2002. **16**(9): p. 963-74.
  56. Ishida, Y., et al., *Absence of IL-1 receptor antagonist impaired wound healing along with aberrant NF-kappaB activation and a reciprocal suppression of TGF-beta signal pathway*. J Immunol, 2006. **176**(9): p. 5598-606.
  57. Luckraz, H., et al., *Microvascular changes in small airways predispose to obliterative bronchiolitis after lung transplantation*. J Heart Lung Transplant, 2004. **23**(5): p. 527-31.
  58. Tuuminen, R., et al., *Donor simvastatin treatment abolishes rat cardiac allograft ischemia/reperfusion injury and chronic rejection through microvascular protection*. Circulation, 2011. **124**(10): p. 1138-50.
  59. Gawaz, M., H. Langer, and A.E. May, *Platelets in inflammation and atherogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3378-84.
  60. Del Conde, I., et al., *Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system*. The Journal of experimental medicine, 2005. **201**(6): p. 871-9.
  61. Lane, H.A., et al., *mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) has antiangiogenic/vascular properties distinct from a VEGFR tyrosine kinase inhibitor*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(5): p. 1612-22.
  62. Liu, Y., et al., *Rapamycin increases pCREB, Bcl-2, and VEGF-A through ERK under normoxia*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2013. **45**(4): p. 259-67.
  63. Heim, C., et al., *Delayed therapy with clopidogrel and everolimus prevents progression of transplant arteriosclerosis and impairs humoral alloimmunity in murine aortic allografts*. Eur J Cardiothorac Surg, 2015. **47**(1): p. 180-7.
  64. Jin, Y.P., et al., *Everolimus inhibits anti-HLA I antibody-mediated endothelial cell signaling, migration and proliferation more potently than sirolimus*. Am J Transplant, 2014. **14**(4): p. 806-19.
  65. Zhang, X. and E.F. Reed, *Effect of antibodies on endothelium*. Am J Transplant, 2009. **9**(11): p. 2459-65.

## 7. Danksagung

Ich danke **Prof. Dr. med Stephan Ensminger** für die Betreuung meiner Arbeit. Mir wurde damit nicht nur ein Weg in die Wissenschaft eröffnet, sondern ich wurde auch durch die Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen auf diesem Weg bestärkt. Ebenso danke ich **Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers** für die Annahme und Betreuung meiner Arbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Mein Dank geht an **Prof. Dr. med. Michael Weyand**, in dessen Forschungslabor des Zentrums für Herzchirurgie Erlangen-Nürnberg, diese Arbeit angefertigt wurde, sowie das **Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung** für die Finanzierung meiner Arbeit. Den **Tierpflegern** des Franz-Penzoldt-Zentrum Erlangen danke ich für das Versorgen meiner Mäuse.

**Dr. med. Christian Heim** danke ich für das geduldige Vermitteln der Transplantationstechniken und die Unterstützung bei der ersten eigenen Publikation. Des Weiteren danke ich **Dr. rer. nat. Martina Ramsperger-Gleixner** für die Einarbeitung in das Labor und die kritische Stimme bei dem Anfertigen dieser Arbeit. Auch wenn man Kritik nicht gerne hört, ist sie wichtig! Ein besonderer Dank geht an **Nina Koch**, ohne die vieles im Labor gar nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank an **Dr. rer. nat. Susann Görner** für ihre Hilfe und die angenehme Gesellschaft.

Ich danke **meiner Mutter**, die mich in allen Belangen stets unterstützt und vieles erst ermöglicht hat.

**Maritta von Silva-Tarouca**, dir danke ich für den Rückhalt und die Bestätigung. Auch wenn ich vielleicht manchmal schwer zu ertragen war, standst du stets zu mir.

Und mit an wichtigster Stelle danke ich den **Mäusen** – den wahren Helden der Wissenschaft.